

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Vojtěch Pavluch

**Studium signalizace a cytoprotektivního potenciálu kanabinoidních GPR55
receptorů v PC12 buňkách**

**A study of signaling and cytoprotective potential of cannabinoid GPR55
receptors in PC12 cells**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 9. 8. 2016

.....

Vojtěch Pavluch

Poděkování:

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému DSc. za vedení mé práce, cenné rady, ochotu a čas, který mi v průběhu zpracování mé diplomové práce věnoval. Chtěl bych také poděkovat kolektivu laboratoře za příjemné pracovní prostředí a za pomoc, která mi pomohla práci zkompletovat. Poděkování za podporu patří rovněž mé rodině a přátelům.

Abstrakt

Koncem 20. století bylo známo, že kanabinoidní látky interagují se dvěma receptory, CB₁ a CB₂. Následné farmakologické studie však potvrdily, že existují další receptory vážící kanabinoidy. GPR55 je transmembránový s G proteiny spřažený receptor, který se spolu s receptory GPR18 a GPR119 řadí do skupiny nových kanabinoidních receptorů a podílí se na funkci endokanabinoidního systému. Kromě některých kanabinoidních látek je stimulován především fosfolipidem lysofosfatidylinositolem. LPI-dependentní signalizace GPR55 hraje důležitou roli v regulaci mnoha fyziologických a patologických procesů jako je bolest, zánět, buněčná proliferace nebo funkce endotelu. Bylo zjištěno, že aplikace LPI způsobuje toleranci k ischemickému poškození mozku a má cytoprotektivní účinek na pyramidální buňky. Cílem práce bylo zjistit, zda po aplikaci pěti ligandů dochází k fosforylaci proteinkináz ERK 1/2, Akt, k aktivaci GTPázy RhoA a zda má aktivace receptoru GPR55 cytoprotektivní efekt v modelové buněčné linii PC12, u které byly simulovány hypoxické podmínky přidáním CoCl₂. Pro práci byly využity metody SDS-PAGE, Western blotingu a kolorimetrických měření. Farmakologické studie posledních let ukázaly rozporuplnost v klasifikaci ligandů pro GPR55. Vzhledem k tomu, že některé výzkumy řadí konkrétní ligand mezi agonisty, jiné mezi antagonisty nebo jim nepřisuzují žádný efekt, bylo důležité zjistit, jakým způsobem koncentrační, respektive časová řada ligandů ovlivňovala signální dráhy GPR55. LPI byl doposud ve všech vědeckých pracích stanoven jako agonista GPR55. Aktivace GPR55 může hrát zásadní úlohu v regulaci mechanismů apoptózy. Stanovení exprese regulačních proteinů Bax, Bcl-2 pomohlo objasnit, zda působení CoCl₂ indukovalo jejich expresi a zda měla stimulace GPR55 anti-apoptotické účinky. Nepodařilo se zjistit závislost intenzity fosforylace proteinkináz na zvyšující se koncentraci ligandu a nepodařilo se potvrdit, že aplikace inverzního agonisty GPR55 CID-16020046 fosforylaci indukovanou jiným ligandem snižuje. Pomocí metody Western blotingu byla detekována zvýšená exprese proteinu BAX po aplikaci CoCl₂. Tyto výsledky ukazují na nejasnou klasifikaci ligandů pro GPR55 a demonstrují, že CoCl₂ mimikuje hypoxické podmínky tvorbou ROS a indukuje apoptózu zvýšením exprese proapoptotického proteinu Bax.

Klíčová slova: GPR55, lysofosfatidylinositol, endokanabinoidy, fosforylace, apoptóza, hypoxie, chlorid kobaltnatý

Abstract

At the end of the 20th century it was known that cannabinoid drugs interact with two receptors, CB₁ and CB₂. Subsequent pharmacological studies have confirmed that there are other receptors interacting with cannabinoids. GPR55 is a transmembrane G protein coupled receptor, which together with the receptor GPR18 and GPR119 belong to a group of new cannabinoid receptors and is involved in the function of the endocannabinoid system. In addition to some of cannabinoid substances, it is stimulated primarily phospholipid lysofosfatidylinositolem. LPI-dependent signaling GPR55 plays an important role in the regulation of many physiological and pathological processes, such as pain, inflammation, cell proliferation, or endothelial function. It was found that LPI confers tolerance to ischemic brain damage and has a cytoprotective effect on the pyramidal cells. The aim of the study was to determine whether the application of five ligands induce phosphorylation of protein kinase ERK 1/2, Akt and activate the GTPase RhoA and whether activation of the receptor GPR55 has cytoprotective effect in model cell line PC12, in which hypoxic conditions were simulated by adding CoCl₂. For working methods were used SDS-PAGE, Western blotting and colorimetric measurement. Pharmacological studies in recent years have shown inconsistency in the classification ligand for GPR55. Given that some research lies between the specific ligand agonists, antagonists or different between them does not assign any effect, it was important to determine how the concentration, respectively, the time series of action of ligands affected the GPR55 signaling pathway. LPI was determined in all scientific work as the GPR55 agonist. Activation of GPR55 may play a crucial role in the regulation of apoptosis. Determination of expression of regulatory proteins Bax, Bcl-2 helped to clarify whether the action of CoCl₂ induced their expression and whether the GPR55 stimulation had anti-apoptotic effects. We failed to determine the dependence of the intensity of phosphorylation by protein kinases to the increasing concentration of the ligand and failed to acknowledge that the application of the inverse agonist GPR55 CID-16020046 decreased phosphorylation induced by another ligand. By Western blotting overexpression of Bax was detected after application of CoCl₂. These results show the ambiguous classification of ligands for GPR55 and demonstrate that CoCl₂ mimics hypoxic conditions and the formation of ROS and induces apoptosis by increasing the expression of proapoptotic protein Bax.

Key words: GPR55, lysophosphatidylinositol, endocannabinoids, phosphorylation, apoptosis, hypoxia, cobalt chloride

Obsah

Abstrakt.....	4
Obsah.....	6
Seznam zkratek	8
Úvod.....	12
Literární přehled	13
Receptory spřažené s G proteiny.....	13
Receptor GPR55.....	14
Struktura GPR55	14
Distribuce GPR55 ve tkáních.....	15
Farmakologie GPR55	15
Signální dráhy GPR55.....	18
GPR55 ^{-/-} myši.....	21
Fyziologická úloha GPR55	21
Buněčná linie PC12	24
Apoptóza	25
Role mitochondrií v apoptóze	27
Reaktivní kyslíkové radikály.....	28
Peroxidace lipidů.....	29
Karbonylace proteinů	31
Hypoxie a role CoCl ₂	33
Cíle diplomové práce.....	34
Materiál a metody	35
Kultivace buněk.....	35
Použité ligandy.....	36
Fosforylace	37
WST-1 test.....	39
Aplikace ligandů, CoCl ₂ a zpracování buněk	40
Analýza exprese proteinů pomocí metody imunoblotingu	41
Stanovení koncentrace proteinů	41

SDS-PAGE elektroforetická separace	43
Příprava vzorku	43
Postup práce	43
Western blotting (imunoblotting)	46
Postup práce:	46
Kolorimetrické stanovení peroxidace lipidů	48
Postup práce	48
Kolorimetrické stanovení karbonylace proteinů	49
Postup práce:	49
Mikroskopická pozorování	51
Statistické zpracování výsledků	51
Výsledky	52
Karbonylace proteinů	52
Lipoperoxidace	54
Signalizace	56
Fosforylace ERK 1/2	57
Fosforylace Akt (PKB)	62
Aktivace RhoA	67
Exprese Bax a Bcl-xL	69
Detekce ROS pomocí fluorescenční mikroskopie	74
Diskuze	75
Závěr	78
Seznam použité literatury	79

Seznam zkratek

[³⁵ S]GTPγS	pomalu hydrolyzovatelný analog guanosintrifosfátu
[³ H]-LPI	triciem značený lysofosfatidylinositol
Δ ⁹ THC	tetrahydrokanabinol
2-AG	2-arachidonoylglycerol
A2780	buněčná linie z nádoru vaječníku
ABCC1	adenosintrifosfát vazebný protein
ACTH	adrenokortikotropní hormon
AEA	arachidonoyletanolamid
Akt (PKB)	proteinkináza B
AM251	inverzní agonista CB ₁ receptoru
AP-1	transkripční faktor
Apaf-1	protein v mitochondriální dráze apoptózy
APS	peroxodisíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
Bad	proapoptotický protein
Bak	proapoptotický protein
Bax	proapoptotický protein
BCA	analýza bicinchoninovou kyselinou
Bcl-2	genová rodina regulátorů apoptózy
Bcl-xL	antiapoptotická forma proteinu z rodiny Bcl-2
BMI	index tělesné hmotnosti
Bmx	proteinkináza
Bod	proapoptotický protein
B-Raf-1	proteinkináza
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CB ₁	podtyp kanabinoidního receptoru
CB ₂	podtyp kanabinoidního receptoru
CBD	kanabidiol
Cdc42	monomerní GTPáza
CID-16020046	inverzní agonista GPR55 receptoru

CNS	centrální nervová soustava
CoQ	koenzym Q v oxidovaném stavu
CoQH ₂	koenzym Q v redukovaném stavu
CP55940	syntetický agonista kanabinoidních receptorů
CREB	transkripční faktor
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNPH	dinitrofenylhydrazin
Drp-1	protein mitochondriálního dělení
DU-145	buněčná linie z nádoru prostaty
EC50	koncentrace ligandu při obsazení poloviny vazebných míst receptoru
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
EGTA	etylen glykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
ER	endoplazmatické retikulum
ERK	extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza
Etk	proteinkináza
Fas/CD95	receptor vnější dráhy apoptózy
FBS	fetální hovězí sérum
GDP	guanosindifosfát
GIT	gastrointestinální trakt
GPCRs	receptory spřažené s G proteiny
GTP	guanosintrifosfát
HEK293	buněčná linie z embryonálních buněk ledvin
HeLa	buněčná linie z nádoru děložního hrdla
HIF	hypoxií indukovaný faktor
HREs	k hypoxii citlivé vazebné elementy
HS	koňské sérum
Hsp60	protein teplotního šoku
Hsp70	protein teplotního šoku
IC50	koncentrace ligandu při inhibici poloviny vazebných míst receptoru
IP ₃	inositoltrifosfát
IRP2	k železu citlivý protein
JWH015	selektivní agonista CB ₂ receptoru

LoVo	buněčná linie z nádoru lymfatických uzlin
LPI	lysofosfatidylinositol
MAP	mitogenem aktivovaná proteinkináza
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MTT	test stanovení metabolické aktivity buněk
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid v oxidovaném stavu
NADH	nikotinamidadenindinukleotid v redukovaném stavu
NFAT	transkripční faktor
NF-κB	transkripční faktor
NGF	nervový růstový faktor
O-1602	selektivní agonista receptoru GPR55
OEA	oleyletanolamid
OMM	vnější mitochondriální membrána
OVCAR3	buněčná linie z nádoru vaječníku
P-1677	standard molekulových hmotností
P2Y5	purinergní receptor
P450	cytochrom P450
p53	tumor supresorový gen
PACAP	adenylylcyklázu aktivující polypeptid
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PBS	fosfátový pufr
PC12	buněčná linie
PC-3	buněčná linie z nádoru prostaty
PEA	palmitoyletanolamid
PKA	proteinkináza A
PLA ₂	fosfolipáza A ₂
PLC	fosfolipáza C
PVDF	polyvinylidenfluoridová membrána
Rac	monomerní GTPáza
Ras	protoonkogen
RCS	reaktivní karbonylové radikály
RhoA	monomerní GTPáza
ROCK	s RhoA asociovaná proteinkináza
ROS	reaktivní kyslíkové radikály

RPN755-E	nízkomolekulární standard molekulových hmotností
SDS	dodecylsírán sodný
siRNA	interferující ribonukleová kyselina
SR141716A	selektivní antagonist CB ₁ receptoru
Src	protoonkogen
SRE	transkripční faktor
TBST	Trisový pufr s Tweenem
TCA	trichloroctová kyselina
TEMED	tetrametyletylendiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
TGM	blotovací pufr
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometan
Triton X-100	neionogenní detergent, polyetylenoxid
Tween	polyoxoetylen sorbitan monolaurát
U73122	inhibitor fosfolipázy C
VHL	Von Hippel-Lindau protein
WST-1	ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl
Y-27632	inhibitor proteinkinázy ROCK
YM254890	inhibitor Gα _{q/11} podjednotky

Úvod

Produkty z rostliny *cannabis sativa* jsou ve společnosti využívány tisíce let pro svůj medicínský význam. Extrakty obsahují desítky kanabinoidů, z nichž nejvýznamnější je psychoaktivní Δ^9 -THC, kanabidiol a kanabinol. Kanabinoidy ovlivňují skrze vazbu na membránové kanabinoidní receptory buněčný metabolismus. V devadesátých letech byly identifikovány a klonovány dva podtypy kanabinoidních receptorů. Subtyp CB₁ je exprimován především v CNS, zatímco subtyp CB₂ se nachází na periférii, především v imunitních buňkách. Vysoká míra exprese CB₂ je u B-lymfocytů a NK buněk. Oba dva subtypy zprostředkovávají efekt exogenních i endogenních kanabinoidů a jsou spřaženy s Gα_i podjednotkou. Na konci devadesátých let byl identifikován receptor GPR55. Tento receptor je také sedmkrát membránou procházející receptor z rodiny GPCRs a je spřažen s podjednotkami Gα₁₃ a Gα_{q/11}. Jeho úloha není dosud zcela jednoznačně objasněna. Ukázalo se, že může být aktivován některými fyto-kanabinoidy, endokanabinoidy nebo syntetickými kanabinoidy. Výsledky prací jednotlivých laboratoří se však mnohdy liší, a tak je některým látkám přisuzován agonistický i antagonistický efekt. Tato rozdílná pozorování vyplývají z rozdílných buněčných typů nebo umělých systémů se zvýšenou mírou exprese GPR55 použitých v experimentech. Nejvýznamnějším endogenním agonistou GPR55 je LPI. Byly připraveny i syntetické agonisté a antagonisté. Jelikož může být GPR55 aktivován některými endogenními kanabinoidy, ukazuje to na jeho možnou roli v endokanabinoidním systému. Endokanabinoidní systém je složen z kanabinoidních receptorů a jejich endogenních ligandů, ovlivňován může být fyto-kanabinoidy nebo syntetickými kanabinoidy. Vzhledem k tomu, že jsou kanabinoidní receptory distribuovány po celém těle, je fyziologická úloha endokanabinoidního systému velmi rozmanitá. Modulační endokanabinoidního systému naskýtá terapeutické možnosti léčby depresí, Huntingtonovy choroby, Parkinsonovy choroby, sklerózy, rakoviny nebo hypertenze. Protože je GPR55 exprimován téměř ve všech tkáních lidského těla a je aktivován řadou endogenních i exogenních kanabinoidů, může se podílet na regulaci řady fyziologických i patofyziologických procesech organismu. Farmakologické studie na buněčných liniích pomohly objasnit signální dráhy GPR55. Srovnání studií na umělých a přirozených buněčných systémech pomůže kategorizovat potenciální ligandy mezi agonisty nebo antagonisty. Možné terapeutické využití receptoru bude nutné studovat jednak u GPR55^{-/-} myši a jednak u standardních myši po dlouhodobé administraci vysoce selektivních ligandů.

Literární přehled

Receptory spřažené s G proteiny

Receptory spřažené s trimerními G proteiny jsou membránové receptory, které se účastní buněčné signalizace tím, že reagují na signální molekuly, mezi které patří různé hormony, neurotransmitery, proteiny nebo léky. Receptory spřažené s G proteiny jsou jednou z největších rodin proteinů kódovaných více než osmi sty geny lidského genomu. Zajišťují signální transdukcii po vazbě extracelulárního ligandu a podílí se tak na regulaci buněčné homeostázy a aktivity. Všechny GPCRs mají 7 α -šroubovic procházejících buněčnou membránou. Přítomnost C a N konce receptoru v cytosolu a extracelulárním prostředí se liší podle daného typu receptoru. Po vazbě ligandu prochází GPCRs konformační změnou, která může vést k aktivaci cytosolických signálních proteinů a v určitou buněčnou odpověď. V inaktivním stavu je na α podjednotce trimerního proteinu navázán GDP. Po aktivaci receptoru dojde k výměně GDP za GTP, přičemž se α podjednotka oddělí od dimeru $\beta\gamma$. α podjednotka i dimer $\beta\gamma$ pak aktivují efektorové proteiny. Aplikace řady látek na GPCRs se využívá při terapeutické léčbě řady onemocnění, jako jsou poruchy srdečního rytmu, astma nebo bolesti. Nesenzorické receptory se rozdělují na základě jejich farmakologických vlastností do několika tříd; třída A rodopsinových receptorů, která je nejrozsáhlejší, třída B secretinových receptorů, třída C metabotropních glutamát/feromonových receptorů a třída "frizzled" receptorů. Mezi senzorické GPCRs se řadí receptory pro světlo, pachy a receptory v chuťových pohárcích. Pro molekulární analýzu jednotlivých receptorů se využívají metody krystalografie, které objasňují jejich strukturu, vazebné místo a umožňují predikovat typ ligandů interagujících s daným receptorem (Venkatakrishnan et al., 2013).

Jednotlivé typy GPCRs se od sebe liší tím, že v cytosolu interagují s rozdílnými podtypy G proteinů a modulují tak různé signální dráhy. Distribuce konkrétních typů GPCRs v buňkách a tkáních ovlivňuje citlivost buněk k ligandům těchto GPCRs. Rolí GPCRs je zprostředkovat komunikaci mezi extracelulárním prostředím a buňkou. (Rosenbaum et al., 2009).

Účinnost ligandu a biologická odpověď je dána chemickou strukturou ligandu a biofyzikálními vlastnostmi receptoru. Přírodní i syntetické ligandy se dělí do několika skupin na základě jejich rozdílné účinnosti. Plným agonistou je látka schopná vyvolat maximální odpověď receptoru, parciální agonista není schopen vyvolat maximální odpověď receptoru i při maximální saturaci a neutrální antagonisté nevyvolávají žádnou odpověď receptoru, ale svojí vazbou na receptoru zabraňují jiným ligandům se na tento určitý receptor vázat. K inverzním agonistům patří látky snižující bazální úroveň aktivity receptoru. Energie přenosu mezi vazebným místem receptoru a místem interakce s G proteiny je závislá na mnoha

interakcích mezi receptorem a ligandem a nespočívá pouze v okupování vazebného místa. Biofyzikální experimenty ukazují, že parciální a plní agonisté lišící se funkčními skupinami své chemické struktury stabilizují rozdílné konformační stavy receptoru. Určitá konformace stabilizovaná strukturou ligandu určuje účinnost signalizace konkrétní dráhy. Mnoho GPCRs může stimulovat rozličné signální dráhy a konkrétní ligandy mají rozdílnou účinnost v různých signálních drahách. Například u β_2 adrenergických receptorů jsou agonisté MAP kinázové dráhy inverzními agonisty dráhy stimulující G_{α_s} , cAMP a PKA. Metody solubilizace a krystalizace GPCRs umožnily poznat nejvýznamnější strukturní odlišnosti mezi typy GPCRs. Je to především rozdíl v extracelulárních smyčkách α šroubovic a vazebné místo ligandu. Vysoce konzervovaná struktura ligand vazebného místa je přívrstvem podrodin GPCRs, například receptorů pro dopamin, serotonin nebo histamin (Rosenbaum et al., 2009).

Mezi významné GPCRs patří adrenergní receptory. Vazba adrenalinu a noradrenalinu na β_2 adrenergní receptory vede k aktivaci stimulační podjednotky heterotrimerního G proteinu G_{α_s} , která stimuluje adenylycyklázu. Ta produkuje cAMP, jenž dále aktivuje PKA, která fosforyluje další efektorové proteinu v buňce a např. ve svalových buňkách je zodpovědná za kontrakci. Vedle toho jsou v kardiomyocytech β_2 adrenergní receptory spřaženy jak se stimulační G_{α_s} , tak i s inhibiční G_{α_i} podjednotkou, která aktivitu adenylycyklázy tlumí (Xiao et al., 1999).

Receptor GPR55

GPR55 je sedmkrát membránou procházející receptor řadící se do rodiny GPCRs A. V průběhu výzkumu kanabinoidních receptorů CB_1 a CB_2 se ukázalo, že některé kanabinoidy zprostředkovávají svůj efekt nezávisle na těchto receptorech. To podporovalo hypotézu, že existuje další receptor citlivý na rostlinné i endogenní kanabinoidy. Vzhledem k rozmanitým fyziologickým funkcím kanabinoidů se výzkum třetího typu kanabinoidního receptoru stal předmětem zájmu řady prací například v souvislosti s regulací energetického metabolismu nebo s neurobiologií (Liu et al., 2015).

Struktura GPR55

Bylo popsáno několik aminokyselinových sekvencí GPR55, tyto rozdíly mohou reprezentovat rozdílné molekuly, polymorfismy nebo jsou to chyby klonování a sekvenování. Nejsou to však varianty alternativního sestřihu, neboť gen pro GPR55 postrádá introny. Například varianta GPR55A se liší od originální sekvence GPR55 přítomností aminokyselinové sekvence LRSPRKIFGIC místo SGPPGRSLGSA. Tato část proteinu reprezentuje druhou nitrobuněčnou doménu a čtvrtou transmembránovou doménu. Průzkum

translace nukleotidové sekvence mRNA pro GPR55 ukázal, že záměna těchto aminokyselinových sekvencí je v důsledku posunu čtecího rámce, jenž mohl nastat jako chyba v klonování a sekvenování (Baker et al., 2006).

GPR55 byl identifikován metodami *in silico*. Jeho gen leží u člověka na 2. chromozomu, pozici 2q37 a kóduje protein o délce 319 aminokyselin. Obsahuje sekvenční motivy pro glykosylaci a fosforylaci proteinkinázami A a C. U myši se mRNA pro GPR55 nachází na chromozomu 1 a kóduje protein dlouhý 327 aminokyselin. Další ortology genu pro GPR55 byly identifikovány v genomu potkana, myši, psa, krávy a šimpanze. Přítomnost mRNA nebyla prokázána u ptáků ani ryb, což naznačuje, že je GPR55 exprimován pravděpodobně jen u savců. GPR55 vykazuje jen malou homologii na úrovni aminokyselinové sekvence s kanabinoidními receptory CB₁ a CB₂ (10-15 %) a postrádá typické vazebné kanabinoidní místo. Mezi receptory s nejvyšší mírou homologie patří GPR35, GPR92, GPR23 a purinergní receptor P2Y5 (Sawzdargo et al., 1999).

Distribuce GPR55 ve tkáních

mRNA kódující tento receptor byla u člověka zaznamenána v oblastech mozku, v hipokampu, nucleus caudatus, putamen, mozkovém kmeni, mozečku, hypothalamu, striatu nebo v neuronech dorzálních kořenů míšních. Analýza společnosti GlaxoSmithKline odhalila dále expresi v ileu, slezině, lymfatických uzlinách, varlatech a tukové tkáni prsou (Baker et al., 2006). Míra exprese GPR55 byla ve většině studií vztažena na míru exprese mRNA. Některé studie se zaměřily na analýzu exprese proteinů pomocí metody Western blotingu.

Farmakologie GPR55

V současné době je farmakologie GPR55 v souvislosti s kanabinoidy kontroverzní. Kanabinoidy lze rozdělit na rostlinné, endogenní a syntetické a některé aktivují, jiné inhibují aktivitu GPR55. Závěry různých vědeckých prací však vyvolávají diskuze o agonismu nebo antagonismu těchto látek na GPR55. U většiny látek na tom zatím neexistuje v odborné společnosti všeobecně přijímaný konsenzus. Shoda je na tom, že receptor GPR55 hraje důležitou úlohu v endokanabinoidním systému.

Endokanabinoidní systém se skládá z kanabinoidních receptorů CB₁, CB₂, endogenních kanabinoidů a z enzymů účastnících se jejich biosyntézy a degradace. Mezi nejvýznamnější endokanabinoidy patří arachidonoyletanolamin (AEA) a 2-arachidonoylglycerol (2-AG). Tyto látky jsou organismem syntetizovány a degradovány podle potřeby. Enzymy zodpovědné za produkci a degradaci těchto ligandů jsou také součástí endokanabinoidního systému. 2-AG je produkován z diacylglycerolu diacylglycerol lipázou a

degradován zpět na diacylglycerol monoacylglycerol lipázou. AEA je syntetizován z N-arachidonoyl-fosfatidyletanolaminu N-acyl-fosfatidyletanolamin fosfolipázou D a degradován na arachidonovou kyselinu a etanolamin amid hydrolázou mastných kyselin.

Endokanabinoidní systém hraje důležitou roli v patofyziologii obezity, osteoporózy, zánětlivé a neuropatické bolesti a kardiovaskulárních či jaterních onemocněních (Fowler et al., 2005).

Mezi rostlinné kanabinoidy interagující s endokanabinoidním systémem patří především Δ^9 THC a kanabidiol. Komplexní farmakologie endokanabinoidů je zprostředkována kanabinoidními receptory CB₁ a CB₂ a receptorem GPR55. Efekty kanabinoidních ligandů bez účasti CB₁ a CB₂ byly pozorovány po aplikaci anandamidu, virodaminu, abnormálního kanabidiolu nebo látky O-1602. O-1602 je syntetický analog fyto-kanabinoidu kanabidiolu (CBD) a postrádá vazebnou afinitu pro CB₁ i CB₂. Rozporuplnost farmakologie GPR55 potvrzuje studie, kdy se CBD choval jako účinný antagonist GPR55. Jiní badatelé navrhli CBD jako agonistu GPR55, neboť vykazoval protektivní účinky u akutní pankreatitidy ve stejném rozsahu jako při použití O-1602.

Postupy pro objasnění vazebné afinity ligandů na GPR55 se využívá [³⁵S]GTP γ S vazebná analýza, při které se měří výměna GDP za GTP jako indikátor aktivace receptoru. Dále se měří zvýšení koncentrace vápenatých iontů, fosforylace ERK nebo aktivace malých monomerních GTPáz rhoA, rac a cdc42.

Postavení endokanabinoidů jako ligandů pro GPR55 je doposud rozporuplné. Schopnost endokanabinoidních eikosanoidů aktivovat GPR55 je stále předmětem diskuzí. Široké spektrum endokanabinoidů i bioaktivních lipidů bylo testováno na buněčných kulturách. V 10 μ M koncentracích anandamidu a 2-AG nedocházelo k fosforylaci ERK a nedocházelo ani ke zvýšení nitrobuněčné koncentrace Ca²⁺. Jiná práce popisuje zvýšení nitrobuněčné koncentrace Ca²⁺ v rozmezí koncentrací 3-30 μ M u buněk HEK293 transfekovaných genem pro GPR55. Tato odpověď však byla shodná i u netransfekovaných buněk (Henstridge et al., 2009), (S. Oka et al., 2009).

Hypotézu, že anandamid a 2-AG jsou účinnými agonisty GPR55 podporují vazebné studie, kdy hodnoty EC₅₀ dosahovaly 18 nM a 3 nM. Anandamid ve většině prací aktivoval GPR55 v koncentracích v rozmezí 5-10 μ M, které jsou znatelně vyšší, než jaké jsou potřeba pro aktivaci CB₁ (Ryberg et al., 2007).

Práce na endoteliálních buňkách dále ukázala, že anandamid narozdíl od 2-AG při koncentraci 5 μ M zvyšuje výlev Ca²⁺. Při zablokování translace použitím siRNA docházelo ke snížení efektu anandamidu. Pokud byla exprese GPR55 zvýšena, efekt anandamidu to posilovalo. Tato práce demonstrovala i vzájemnou regulaci mezi CB₁ receptorem a GPR55. Pro aktivaci GPR55 anandamidem je nezbytné klastrování integrinů α v β ₃ a α 5 β ₁. Tato

aktivace je negativně regulována CB₁ receptorem. Za situace, kdy integriny nejsou klastrovány, anandamid aktivuje CB₁ receptor spřažený s G_i podjednotkou, která aktivuje kinázu Syk a následně translokaci transkripčního faktoru NF-κB. Pokud jsou integriny klastrovány, CB₁ se odpojí od integrinů a uvolní se tak jeho inhibiční vliv na GPR55, který se po vazbě anandamidu aktivuje (Waldeck-Weiermair et al., 2008).

Vazebné studie s AEA a 2-AG ukázaly, že AEA je stejně účinný v aktivaci GPR55, CB₁ a CB₂, zatímco 2-AG je více než dvěstěkrát účinnější v aktivaci GPR55 než CB₁ nebo CB₂. AEA narozdíl od 2-AG zvyšuje na GPR55 závislý vzestup nitrobuněčné koncentrace vápenatých iontů a aktivuje monomerní GTPázu RhoA. V případě buněk HEK293 exprimujících GPR55 nebyl po aplikaci AEA pozorován zvýšený výlev vápenatých iontů (R. A. Ross, 2009).

Mnohem jasnější situace je u bioaktivního lipidu lysofosfatidylinositolu. LPI je účinným agonistou GPR55, po vazbě na GPR55 dochází k fosforylaci ERK nebo mobilizaci Ca²⁺, přičemž nejúčinnější formou LPI je 2-arachidonoyl LPI s hodnotou EC₅₀ = 30 nM (S. Oka et al., 2007).

Farmakologii GPR55 v buněčné linii PC12 demonstruje jediná práce laboratoře Obary. Přinesla důležitý poznatek, že v těchto buňkách je transkribována mRNA pro GPR55. mRNA pro kanabinoidní receptory CB₁ a CB₂ nebyla detekována. Přítomnost GPR55 byla prokázána i na úrovni proteinu. Aplikace LPI indukovala výlev Ca²⁺, aktivovala kinázu RhoA a fosforylaci ERK 1/2. Endogenní a syntetické kanabinoidy žádný z těchto procesů nespouštěly, což podporuje rozporuplnost, zda a za jakých situací kanabinoidy mohou stimulovat GPR55. Po působení NGF došlo u PC12 buněk k diferenciaci a růstu axonů. Aplikace LPI způsobila stahování axonálních výběžků zpět, přičemž jeho efekt je závislý na kináze RhoA a receptoru GPR55. Při použití toxinu C3 proti RhoA nebo siRNA proti mRNA pro GPR55 ke stažení výběžků po aplikaci LPI nedocházelo. Tato signalizace je závislá na Gα₁₃ podjednotce. GPR55 byl po diferenciaci hojně lokalizován na špičce axonů, což ukazuje na jeho možnou roli v regulaci růstu axonů. Stažení axonů po aplikaci LPI bylo doprovázeno redistribucí F-aktinu a ztrátou lehkého řetězce neurofilament. Tento účinek LPI byl zvrácen jen po inhibici Gα₁₃ podjednotky nebo inhibici RhoA. Většina prací zabývajících se rolí kanabinoidů v aktivaci GPR55 pracovala s buňkami HEK293, které měli laboratorně zvýšenou expresi GPR55. Laboratoř Obary používala buňky PC12 s přirozenou úrovní exprese GPR55. Pro výlev Ca²⁺ bylo testováno několik látek, LPI v závislosti na zvyšující se koncentraci spouštělo výlev Ca²⁺. Tento efekt byl zablokován aplikací inhibitoru Gα_q podjednotky, YM254890, v koncentraci 1 μM. Kanabinoidy 2-AG, anandamid, kanabidiol a CP55940 v 10 μM koncentraci zvýšení nitrobuněčné koncentrace Ca²⁺ nevyvolávaly. I

fosforylace ERK 1/2 je spřažena s $G\alpha_q$ podjednotkou, jelikož inhibitor YM254890 inhiboval fosforylaci ERK 1/2 po aplikaci LPI. Stejně tak tomu bylo ohledně aktivace RhoA. Pouze LPI, nikoliv však kanabinoidy CP55940, anandamid, kanabidiol a 2-AG aktivoval RhoA. To, že GPR55 není spřažen s $G\alpha_s$ podjednotkou, se potvrdilo, když aplikace LPI a dalších kanabinoidů v 10 μM koncentraci nezvyšovala produkci cAMP (Obara et al., 2011).

Mezi rostlinnými a syntetickými kanabinoidy se také nachází agonisté GPR55. Syntetický analog kanabidiolu O-1602 a $\Delta^9\text{THC}$ jsou účinnými agonisty. Molekula JWH015 je agonistou, zatímco jeho strukturní analog je na GPR55 neaktivní. K dalším syntetickým látkám s vysokou afinitou se řadí AM251. Rozporuplná je úloha Rimonabantu (SR141716A), který u HEK293 buněk exprimujících GPR55 působil jako antagonistu výlevu Ca^{2+} , v jiných pracích byl popsán jeho agonistický efekt (Lauckner et al., 2008).

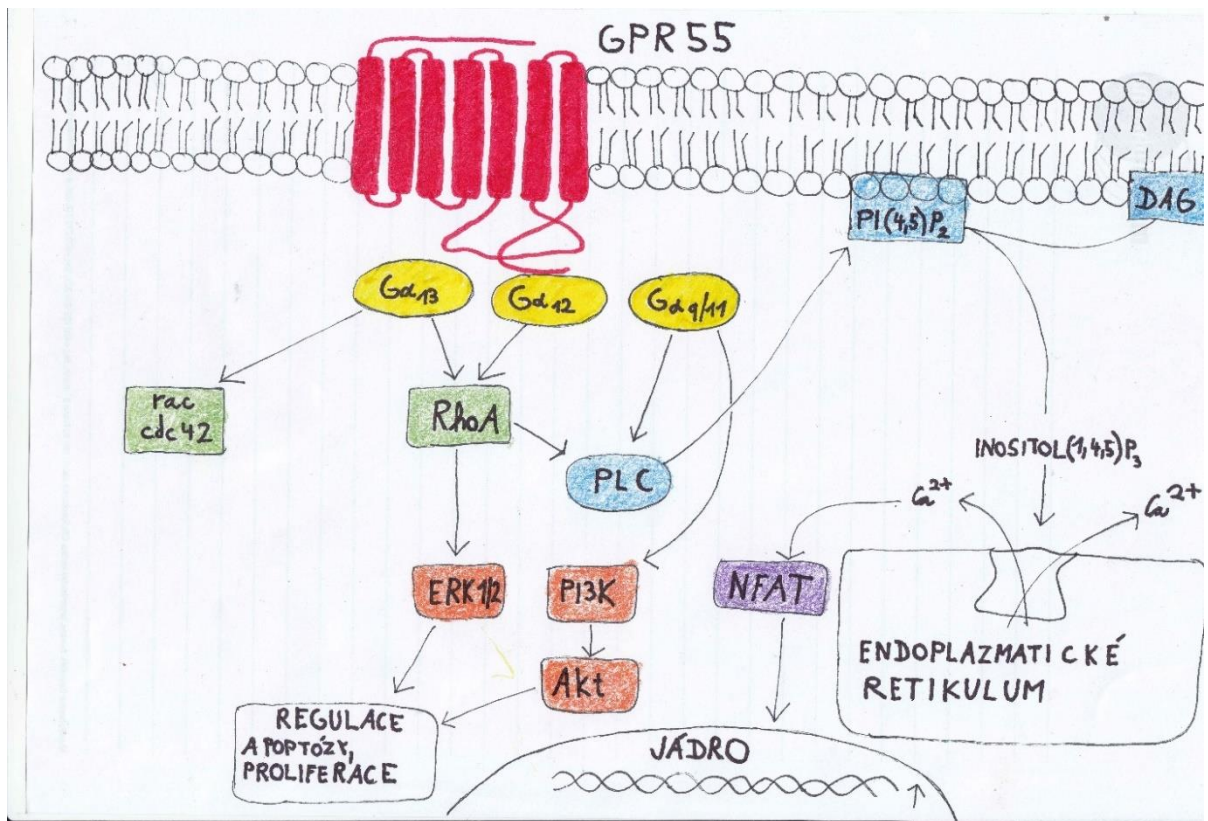
K nejdůležitějším antagonistům GPR55 patří molekula CID-16020046. U kvasinek stabilně exprimujících GPR55 CID-16020046 inhiboval konstitutivní aktivitu GPR55 v rozmezí koncentrací 40 nM-10 μM , přičemž $\text{IC}_{50} = 0,15 \mu\text{M}$. U buněk HEK293 stabilně exprimujících GPR55 došlo při aplikaci 10 μM koncentrace CID-16020046 15 minut před aplikací 10 μM LPI k inhibici výlevu Ca^{2+} . Podobně CID-16020046 v koncentraci 2,5 μM inhiboval fosforylaci ERK 1/2. Jelikož stimulace GPR55 vede k aktivaci řady transkripčních faktorů, NFAT, SRE, NF- κB a CREB, byl testován i efekt CID-16020046 na tuto aktivaci. Ukázalo se, že v závislosti na zvyšující se koncentraci CID-16020046 došlo k výraznému poklesu aktivace NFAT, NF- κB a SRE po použití 1 μM koncentrace LPI. CID-16020046 tedy inhibuje aktivaci transkripčních faktorů skrze GPR55. Antagonistický efekt nebyl detekován u HEK293 buněk exprimujících receptor CB_1 . Experimenty s fluorescenčními protilátkami ukázaly, že GPR55 je převážně lokalizován na povrchu buněk. Po 45 minutách působení 2,5 μM koncentrace LPI dochází k internalizaci. Použití CID-16020046 v koncentraci 10 μM 10 minut před aplikací LPI internalizaci inhibovalo (Kargl et al., 2013).

Signální dráhy GPR55

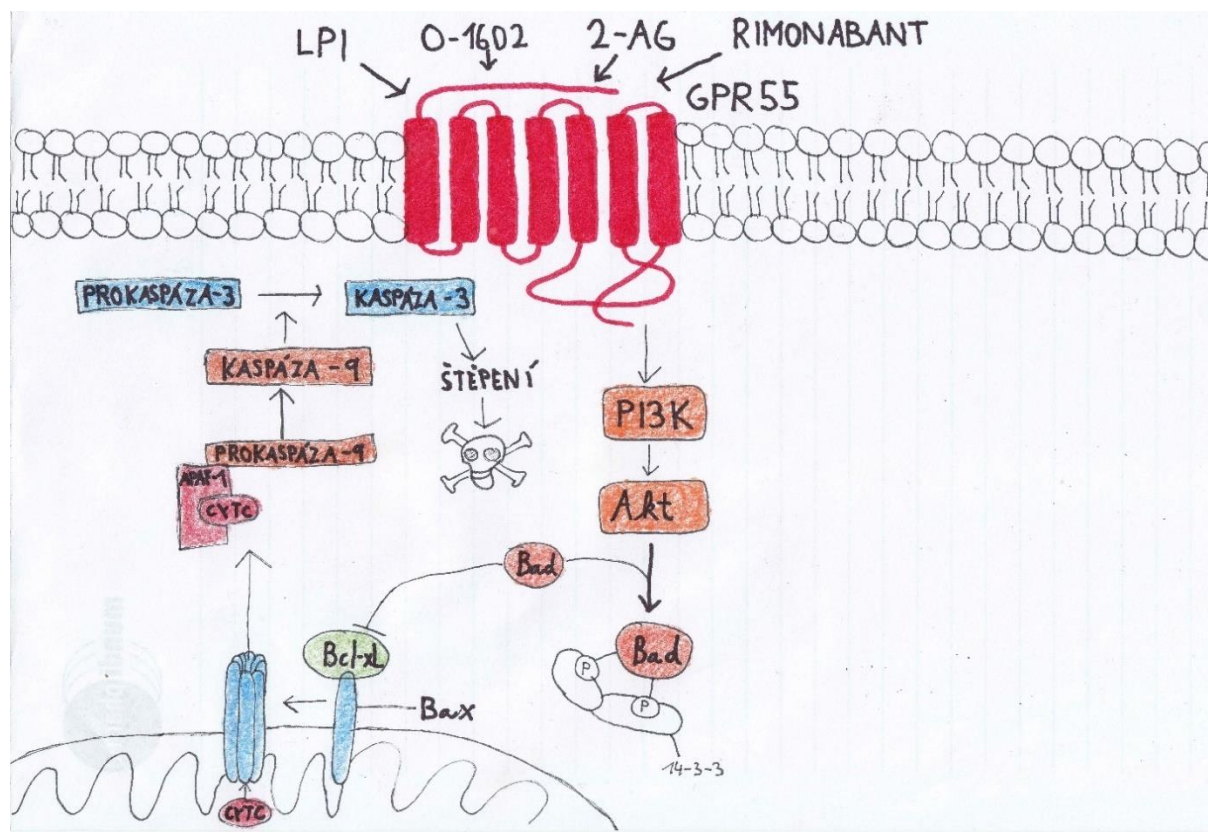
Pro studium signálních kaskád byly využívány přístupy vazebné analýzy [^{35}S]GTP γS a blokování různých typů $G\alpha$ podjednotek peptidy nebo aplikací pertussis toxinu pro ADP ribosylaci. Zablokování podjednotek $G\alpha_{i1/2}$, $G\alpha_{i3}$ a $G\alpha_s$ nemělo žádný efekt v zabránění signalizace po použití agonistů GPR55. Pokud byla zablokována podjednotka $G\alpha_{i3}$, agonistický efekt byl zrušen, což dokládá spřažení GPR55 s podjednotkou $G\alpha_{i3}$, přičemž tato podjednotka je součástí podrodiny proteinů G_{12} , kam patří i $G\alpha_{12}$ podjednotka. Spřažení GPR55 s $G\alpha_{12/13}$ bylo doloženo aktivací kinázy RhoA v důsledku aktivace GPR55. Jelikož po aktivaci GPR55 docházelo ke zvýšení nitrobuňkové koncentrace Ca^{2+} , byly studovány

buněčné dráhy, kterými k tomuto zvýšení dochází. Použitím inhibitoru fosfolipázy U73122 došlo k zamezení výlevu Ca^{2+} . Aktivace GPR55 vede k aktivaci Src kinázy, která fosforyluje fosfatidylinositol-3-kinázu, která fosforyluje kinázy Bmx a Etk. Tyto kinázy pak aktivují PLC γ , která katalyzuje tvorbu IP_3 , jenž po vazbě na receptory v ER spouští uvolnění Ca^{2+} . Tato signalizace je utlumena při použití dominantně negativní $\text{G}\alpha_q$ podjednotky. Při transfekci buněk geny pro dominantně negativní $\text{G}\alpha_{12}$ podjednotky nebo dominantně negativní RhoA kinázu, byl výlev Ca^{2+} po aktivaci GPR55 také utlumen, což naznačuje dvě odlišné signální dráhy pro mobilizaci Ca^{2+} (Lauckner et al., 2008), (Waldeck-Weiermair et al., 2008).

Význam výlevu Ca^{2+} spočívá v tom, že po aktivaci GPR55 může spouštět syntézu endokanabinoidů. V postsynaptických neuronech k tomu dochází po aktivaci $\text{G}\alpha_q$ podjednotky a následné aktivaci PLC. Výlev Ca^{2+} také slouží ke zvýšení vzrušivosti neuronů, syntetizované endokanabinoidy pak ale mohou zpětnovazebně aktivaci presynaptického CB_1 vzrušivost snižovat (Hashimoto et al., 2007). Další důležitou signální kaskádou je fosforylace MAP kináz ERK 1/2 skrze dráhu RhoA-ROCK. Signalizace GPR55 také vede k aktivaci transkripčních faktorů NF- κB a CREB přes dráhu ERK (Saori Oka et al., 2010).



Obr. 1: signální kaskády receptoru GPR55



Obr. 2: Role signální dráhy GPR55 v regulaci apoptózy

GPR55^{-/-} myši

Společnost GlaxoSmithKline připravila myši s chybějícím genem pro GPR55 z důvodu studia vasodilatačních účinků abnormálního kanabidiolu a syntetického analogu O-1602. Závěry studia však neukázaly významný rozdíl arteriálního tlaku nebo srdečního rytmu mezi myši s chybějícím GPR55 a standardními myši. Po aplikaci abnormálního kanabidiolu došlo ke stejnému snížení tlaku jak u GPR55^{-/-} myši tak u kontrolních zvířat. To naznačuje, že účinky abnormálního CBD jsou *in vivo* zprostředkovány jiným mechanismem než přes aktivaci GPR55 (Johns et al., 2007).

Fyziologická úloha GPR55

Vzhledem k tomu, že se kanabinoidy podílejí na udržování energetické homeostáze, regulaci příjmu potravy, ukládání tuků nebo sekrece insulinu, hraje GPR55 významnou roli v regulaci metabolismu. Energetická rovnováha je striktně regulovaný proces mezi příjmem potravy a energetickými požadavky buněk, potažmo tkání, pro metabolismus a růst. Při defektu regulace může nastat zvýšený příjem potravy, který vede k závažným onemocněním jako je diabetes mellitus 2 nebo obezita. Diabetes mellitus 2 je onemocnění vyznačující se hyperglykemií v důsledku zvýšené rezistence periferních tkání k inzulinu.

Například v souvislosti s diabetes mellitus 2 bylo zjištěno, že u pacientů trpících touto nemocí došlo ke zvýšení exprese proteinu GPR55 v tukové tkáni. Fyziologickou roli u diabetu naznačuje také práce, ve které bylo za využití metod imunohistochemie demonstrováno, že GPR55 je exprimován jen v β buňkách pankreatu. Není exprimován v α a δ buňkách. Jednou z příčin diabetes mellitus 2 je obezita. Souvislost GPR55 a obezity ukazuje práce Diaz-Arteaga, kdy dlouhodobá aplikace agonisty O-1602 způsobovala přejídání a v důsledku obezitu. V souladu s tím snižoval antagonist GPR55, CBD, příjem potravy a tělesnou hmotnost při podávání nebo absenci agonisty CB₁, Δ^9 THC. Nejpřesvědčivějším důkazem role GPR55 v regulaci příjmu potravy je zvýšená koncentrace endogenního ligandu LPI, agonisty GPR55, u pacientů trpících obezitou. Exprese GPR55 i koncentrace LPI pozitivně koreluje s hmotností, indexem BMI a množstvím tuku. Kromě zvýšeného příjmu potravy u potkanů po podávání agonisty O-1602 docházelo ke zvýšení příjmu potravy u myši s vypnutým genem pro GPR55. Tyto myši navíc nevykazovaly významný rozdíl ve hmotnosti oproti kontrolním zvířatům. Absence tohoto rozdílu ale může být způsobena zvýšenou expresí CB₁, jehož aktivace zvýšený příjem potravy podporuje (Diaz-Arteaga et al., 2012; Moreno-Navarrete et al., 2012).

Velmi důležitou souvislost našli badatelé laboratoře Ishigura, kteří zkoumali mentální anorexii. Po výzkumu ženské japonské populace našli korelaci mezi náchylností žen k

mentální anorexii a mezi nesynonymní mutací v genu pro GPR55, kdy došlo po translaci k záměně aminokyseliny Glycinu 195 za Valin. Přestože tyto studie poukazují na souvislosti receptoru GPR55 s příjmem potravy, mohou být jejich závěry důsledkem přílišného zjednodušení, protože nelze s jistotou určit, zda vliv antagonisty GPR55 na snížení příjmu potravy je důsledkem inhibice GPR55 nebo interakce s některými jinými receptory (Ishiguro et al., 2011)

Souvislost s regulací příjmu potravy potvrzuje i nález mRNA pro GPR55 v gastrointestinálním traktu v neuronech myenterického plexu tenkého střeva a v tračníku tlustého střeva. Regulace průchodu tráveniny GITem skrze GPR55 byla pozorována po aplikaci O-1602, kdy došlo ke snížení střevní kontrakility a ke zvýšení času průchodu potravy GITem. Tento jev nebyl pozorován u myši s vypnutým genem pro GPR55 (G. R. Ross et al., 2012).

Langerhansovy ostrůvky pankreatu hrají zásadní roli udržování energetické homeostáze sekrecí insulinu po příjmu potravy a glukagonu během hladovění. mRNA pro GPR55 i protein GPR55 byly detekovány u potkanů, myši i člověka v β buňkách Langerhansových ostrůvků, což poukazuje na úlohu GPR55 v regulaci homeostáze glukózy skrze regulaci sekrece insulinu.

O-1602 zesiloval sekreci insulinu z myších, potkaních i lidských ostrůvků, přičemž tento efekt nebyl pozorován u myši s vypnutým genem pro GPR55. Podobné zvýšení sekrece insulinu bylo pozorováno při aplikaci dalších agonistů, AM251, OEA a PEA. Zvýšená sekrece byla inhibována aplikací CBD. V signální kaskádě GPR55 stimulující β buňky pro sekreci insulinu hraje pravděpodobně zásadní roli zvýšený výlev Ca^{2+} . Všichni tito agonisté způsobili rychlý vzestup Ca^{2+} aktivací PLC. Vedle toho však inhibice kinázy ROCK, která je součástí signálních kaskád GPR55 zapříčinila sekreci insulinu z β buněk potkanů. Je tudíž možné, že v ostrůvcích jsou jak stimulační, tak inhibiční signální kaskády asociované s jinými G proteiny (Romero-Zerbo et al., 2011).

Vzhledem k tomu, že je GPR55 exprimován a aktivován LPI v buňkách lymfoblastomu a že se LPI podílí na migraci, orientaci a polarizaci buněk nádoru prsu, hraje GPR55 spolu s LPI důležitou roli v procesech rakoviny. Podporuje to i práce Moneta, která demonstrovala stimulaci migrace nádorových buněk prostaty po aplikaci LPI (Monet et al., 2009). GPR55 je také exprimován v buněčných liniích nádoru vaječníku, konkrétně v linii OVCAR3 a A2780. LPI stimuluje buněčnou proliferaci a diferenciaci u thyroideálních buněk a zvýšená koncentrace LPI je přítomna v thyroideálních a dalších buněčných liniích transformovaných protoonkogenem Ras. V buňkách nádoru prostaty (PC-3 a DU145) a vaječníku (OVCAR3) způsobila aplikace LPI rychlý a přechodný vzestup koncentrace Ca^{2+} a

také fosforylaci ERK 1/2. Koncentrace 100 nM postačovala pro aktivaci ERK 1/2, silnější fosforylace byla detekována při koncentraci 1 μ M. LPI indukoval také fosforylaci proteinkinázy Akt (PKB) na serinu 473 ve všech těchto buněčných liniích. Na těchto rakovinných liniích byl testován vliv CBD, po jehož aplikaci došlo k silnému utlumení výlevu Ca^{2+} v linii PC-3 a inhibici fosforylace ERK 1/2 ve všech třech rakovinných liniích. Testován byl i vliv Rimonabantu (SR141716A), který za stejných experimentálních podmínek působil podobně jako CBD. Fosforylace PKB byla inhibována po aplikaci CBD i Rimonabantu. Po transfekci buněk siRNA pro mRNA GPR55 a následném snížení exprese GPR55 došlo k tomu, že aplikace LPI nevyvolávala zvýšení Ca^{2+} , nedocházelo k fosforylaci ERK 1/2 a také došlo ke snížení bazální fosforylace PKB. Testován byl i vliv receptoru GPR119, o kterém se předpokládalo, že by mohl být dalším receptorem pro LPI. Útlum jeho exprese prostřednictvím siRNA však nezrušilo na LPI závislou fosforylaci ERK 1/2 a ani nedošlo k útlumu výlevu Ca^{2+} po aplikaci LPI. Účast kináz RhoA a ROCK na fosforylaci ERK 1/2 byla potvrzena v liniích DU145 a OVCAR3. Když byla specificky inhibována kináza ROCK inhibitorem Y-27632, nedošlo po aplikaci LPI k fosforylaci ERK 1/2. Výlev Ca^{2+} však tímto postupem utlumen nebyl, což ukazuje, že LPI aktivací GPR55 způsobuje výlev Ca^{2+} nezávisle na signální dráze zahrnující kinázy RhoA a ROCK. To potvrzuje signalizaci GPR55 paralelními drahami (Pineiro et al., 2011).

GPR55 hraje kritickou úlohu v proliferaci. V buněčných liniích PC-3 a OVCAR3 inhibice exprese GPR55 pomocí siRNA kompletně zablokovala proliferaci. Podobná situace nastala po aplikaci Rimonabantu. Kromě toho došlo u PC-3 linie při absenci GPR55 k formování více neuspořádaných a rozprostřených kolonií. Chybějící GPR55 ale neměl vliv na spuštění apoptózy. Objasnění role LPI a GPR55 v proliferaci napomohlo testování cytoplasmatické izoformy fosfolipázy A_2 (PLA_2), která tvorbu LPI katalyzuje. Snížením exprese PLA_2 pomocí siRNA došlo po 48 a 72 hodinách ke snížení počtu buněk u linie PC-3 v porovnání s kontrolou. Aplikace LPI do média absenci PLA_2 vyrovnala a proliferaci buněk vrátila na původní úroveň. To dokládá, že buněčná proliferace je zprostředkována působením LPI, který je produkován PLA_2 . Uvažovalo se, že LPI je uvolňován do extracelulárního prostoru skrze ABCC1 transportér. To se potvrdilo, když inhibice exprese ABCC1 pomocí siRNA také zastavila proliferaci. I u těchto buněk s absencí ABCC1 přenašeče byla proliferace po aplikaci LPI obnovena. U buněk bez GPR55 přidání LPI proliferaci neobnovilo. Tyto výsledky ukazují na důležitou kooperaci LPI, GPR55, PLA_2 a ABCC1 transportéru v roli buněčné proliferace. Dalším důkazem účasti LPI, ABCC1 a PLA_2 v proliferaci byl pokus, kdy po značení buněk triciem a použití média bez lipidů byl v extracelulárním médiu detekován [^3H]-LPI, přičemž po inhibici exprese PLA_2 nebo ABCC1

použitím siRNA došlo k výraznému snížení koncentrace [³H]-LPI v extracelulárním médiu (Pineiro et al., 2011).

Buněčná linie PC12

Pro tuto práci byla využívána buněčná linie PC12, která byla poprvé připravena v laboratoři profesora Greenea v Nové Anglii ve Spojených státech amerických v roce 1976 z krysího nádoru dřeně nadledvin, feochromocytomu. Chirurgickým postupem byly odebrány z potkanů nádory, které byly opatrně rozmělněny. Buňky byly po několikeré centrifugaci a pročištění ve fosfátovém pufru připraveny pro růst v plastových lahvích pokrytých vrstvou kolagenu pro lepší adhezenci buněk. Jedná se o neuronální buňky, které mají oválný nebo polygonální tvar a rostou v malých shlucích. Působením NGF dochází k růstu neuritů podobnému, jaký lze pozorovat u sympatetických neuronů, a po několika týdnech stimulace dosahují délky 500 - 1000 μm . Mají 40 chromosomů a obsahují chromafinní granula dosahující velikosti až 350 nm. Buňky syntetizují katecholaminy dopamin a noradrenalin a do granul je ukládají. Adrenalin ani fenyletanolamin-N-metyltransferáza, která katalyzuje konverzi noradrenalinu na adrenalin, nebyly v buňkách detekovány. K produkci adrenalinu tedy nedochází a nemůže být indukována ani po aplikaci dexametazonu. Po sedmi dnech působení NGF se buňky přestávají dělit. Po odstranění NGF dochází do 24 hodin k degeneraci axonu a do 72 hodin se obnovuje buněčné dělení. Doba zdvojení je přibližně 92 hodin. Buňky si zachovávají své tumorogenní vlastnosti. Po subkutánní injekci do těl potkanů dochází k tvorbě nádorových bulek, ale tvorba metastáz nenastává. Buněčná linie roste nejlépe v médiu RPMI-1640 obsahující 10 % HS a 5 % FBS. Badatelé z laboratoře profesora Greenea zjistili, že přes 70 generací od izolace buněk nedošlo k žádným změnám vlastností jejich růstu, morfologie, citlivosti na NGF nebo obsahu katecholaminů. Tato jejich fenotypová stabilita je předurčuje jako výhodný model pro studium neurobiologických a molekulárních procesů. Jsou využívány pro studium tumorů, mechanismu NGF a jeho roli ve vývoji a diferenciaci neurálních kmenových buněk (D'Arcangelo et al., 1993; Greene et al., 1976). Linie PC12 se dobře hodí pro studium procesů apoptózy, diferenciaci a signálních drah, neboť je jen málo růstových faktorů, hormonů a neutrofinů, na které nereaguje. Mezi klíčové komponenty signalizace patří MAP kinázová dráha, která je nezbytná pro diferenciaci a proliferaci a je aktivována NGF a EGF. Diferenciaci působením NGF přes tyrosinkinázový receptor zajišťuje kináza B-Raf 1 a proto-onkogeny Src a Ras (D'Arcangelo et al., 1993). Receptory spřažené s G proteiny hrají také důležitou roli v diferenciaci. PACAP se váže na jeho receptor spřažený s G proteiny, dochází k fosforylaci ERK a k masivnímu růstu axonů (Barrie et al., 1997).

Apoptóza

Velikost buněčné populace závisí na poměru proliferace a degenerace. Apoptóza je programovaný a regulovaný proces buněčné smrti, který nastává při zárodečném vývoji organismu, končetin, lumen tubulárních struktur orgánů, vývoji žlutého tělíska nebo je důsledkem role imunitního systému při fyziologických nebo patofyziologických jevech. Například snížená koncentrace ACTH v krvi navozuje apoptózu buněk kůry nadledvin. Apoptóza je nutná pro udržování rovnováhy počtu buněk u všech tkáních organismu. Může být indukována i škodlivými exogenními agens, tak se uplatňuje při některých terapeutických postupech proti nádorovým onemocněním. Jedná se o přísně řízený sled morfologických a biochemických změn buňky, které vedou k její smrti. Na rozdíl od nekrózy nevzniká zánět, protože dochází k systematickému a pro organismus šetrnému odstranění buněčného materiálu za účasti endogenních proteáz. V první fázi dochází ke kondenzaci jádra a cytoplazmy a k tvorbě membránou ohraničených apoptotických tělísek, která mají vejčitý tvar a lze u nich pozorovat pyknotické fragmenty jádra. Cytoskelet se rozkládá a DNA se fragmentuje. Některá menší tělíska obsahují pouze kondenzovaný chromatin, jiná hlavně cytoplazmatické elementy. Kondenzace je doprovázena vytlačením vody. V plně vyvinutých tělískách jsou také hustě napěchované organely. Často se nacházejí seskupeny v mezibuněčném prostoru a rozptylují se z místa původu. V druhé fázi jsou tato tělíska fagocytována např. buňkami imunitního systému. Během embryonálního vývoje se na fagocytóze podílí i epitelální buňky. Vzniklý fagozom splývá s lyzozomem. Membrány organel i tělísek se začínají rozpadat a ribozomy se stávají nezřetelnými. Lyzozomy nejsou přímo zodpovědné za vznik degenerace tělísek. Degenerace začíná jako důsledek neschopnosti udržet chemickou homeostázu v rámci fagozomu. Lyzozomální enzymy obsah tělísek rychle degradují až na jednotlivé biomolekuly, které jsou znovu využity jako stavební bloky pro buňku. Apoptóza tedy hraje klíčovou roli udržování homeostáze tkání a recyklace buněčných komponent. Chybná regulace a nesprávný poměr mezi apoptózou a mitózou způsobuje nádorové bujení, je zodpovědná za teratogenezi a vznik malformací a je příčinou některých autoimunitních onemocnění a virových infekcí, protože nedochází k usmrcení lymfocytů reagujících proti vlastní tkáni a buněk infikovaných viry, tudíž není zabráněno rozmnožování virů a šíření infekce. Apoptóza je regulována hormonálními a imunitními faktory a stářím buněk (Kerr et al., 1972). Vnější i vnitřní faktory mohou indukovat apoptózu stejně jako absence některých antiapoptotických látek v extracelulárním prostředí. Tyto způsoby zahájení procesu buněčné smrti umožňují eliminaci buněk, které rostou v nefyziologickém prostředí, jsou geneticky poškozeny, byly produkovány nadměrně nebo byl narušen jejich správný vývoj.

Nyní je známo, že existují evolučně konzervované geny, jimiž kódované proteiny se účastní biochemických drah apoptózy. Mezi takové patří rodina genů *Bcl-2*. Produkty těchto genů jsou esenciální regulační proteiny apoptózy. Mutace v těchto genech je jednou z příčin rakoviny. Do rodiny *Bcl-2* genů patří i *Bcl-xL*. Produktem genu *Bcl-xL* je klíčový regulační protein, který dimerizuje s integrálním proteinem vnější mitochondriální membrány Bax a inhibuje tak dráhu apoptózy (Oltvai et al., 1993). Bcl-xL sídlí na cytoplasmatické straně vnější mitochondriální membrány, na endoplazmatickém retikulu, jaderném obalu a registruje tak jejich poškození (Kroemer, 1997). Míra exprese *Bcl-2* určuje práh pro spuštění apoptózy a je tedy dobrým ukazatelem při diagnóze některých typů nádorových onemocnění (Thompson, 1995). Proapoptotičtí a antiapoptotičtí členové této rodiny spolu mohou heterodimerizovat a v podstatě navzájem titrovat funkci onoho konkrétního proteinu. Konkrétní poměr koncentrací tak funguje jako reostat pro buněčný sebevražedný program (Oltvai et al., 1993).

Mezi nejdůležitější efektorové proteiny apoptózy patří rodina cysteinových proteáz nazývaných kaspázy. Tyto proteázy jsou navzájem homologní a jejich geny jsou evolučně silně konzervované. Substrát štěpí mezi Asp-xxx a rozdělují se do skupin na základě substrátové preference a strukturní podobnosti. Jejich aktivace nevede k hromadné destrukci buněčných proteinů, ale ke štěpení určité sady proteinů. Toto štěpení v důsledku neznamena jen inaktivaci cílových proteinů, ale může vést i k jejich aktivaci štěpením inhibiční regulační podjednotky (Cohen, 1997). Klíčovou roli vykonavatelů apoptózy potvrzuje fakt, že mutace v genech pro kaspázy nebo farmakologická aplikace inhibitorů průběh apoptózy zastavuje nebo zpomaluje (Thornberry et al., 1997). Mezi nejvýznamnější substráty kaspáz se řadí nukleáza, která štěpí jadernou DNA mezi nukleozomy a vytváří tak fragmenty o velikosti přibližně 180 párů bazí (Wyllie, 1980). Morfologickou charakteristikou apoptózy, za kterou jsou kaspázy zodpovědné, je štěpení jaderných laminů nezbytných pro rozpad jaderného obalu (Rao et al., 1996). Kaspázy jsou syntetizovány jako enzymaticky inaktivní zymogeny. Princip jejich aktivace spočívá ve štěpení mezi doménami p20 a p10 v místě Asp-xxx, což je stejná dvojice aminokyselin, mezi kterými samy kaspázy štěpí substrát, a tak mohou být autolyticky aktivovány. Aktivací prokaspázy vzniká aktivní kaspáza, která aktivuje další prokaspázu. Tento způsob integruje a zesiluje proapoptotický singál (Cohen, 1997). Komplexním mechanismem je aktivace prokaspázy 9. Je aktivována po vazbě adaptorového proteinu Apaf-1, který má navázaný cytochrom c uvolněný z mitochondrií. Apaf-1 je v podstatě regulační podjednotka holoenzymu kaspázy 9 tvořící velký komplex, apoptozom. Cytochrom c se uvolňuje z mitochondrií skrze oligomerní kanál tvořený proteiny Bax. Vazba proteinu Bcl-xL na Bax tvoří heterodimer a zabráňuje tak tvorbě kanálu a dalšímu průběhu apoptózy (Finucane et al., 1999; Jurgensmeier et al., 1998).

Jedinou funkcí Bcl-xL není jen zabránit uvolnění cytochromu c z mitochondrií, protože chrání buňky i po uvolnění cytochromu c, zároveň mikroinjekce tohoto cytochromu nezabíjí všechny buněčné typy (Green et al., 1998). Exprese proteinů rodiny Bcl-2 je regulována různými signály, například cytokiny. Exprese Bax je v některých buněčných typech zprostředkována aktivitou p53. Regulace cytokiny zahrnuje posttranslační modifikace, aktivace receptoru pro cytokin spustí fosforylaci kinázy Akt (PKB) fosfatidylinositol-3-kinázou. Akt pak fosforyluje protein Bad, jenž je v tomto stavu vázán proteinem 14-3-3. To znemožňuje, aby se protein Bad vázal na Bcl-xL a inhiboval ho. V konečném důsledku tak Bcl-xL může dimerizovat s proteinem Bax a působit tak cytoprotektivně (Zha et al., 1996). Cytoprotektivně působí proti gama a ultrafialovému záření, dexametazonu, při absenci cytokinů a proti cytotoxickým látkám. Přestože je exprese *Bcl-2* během embryogeneze zvýšená, u myši s vymazaným genem *Bcl-2* nebyl pozorován narušený vývoj, v pozdějších stádiích vývoje však došlo ke zvýšení apoptózy neuronálních buněk, melanocytů, lymfocytů a k poškození ledvin (Veis et al., 1993). Souvislost s rakovinou lymfocytické chronické leukémie a folikulárního lymfomu a Bcl-2 byla potvrzena u transgenních myši. Tyto myši měly nadbytek B-lymfocytů (Cory et al., 1994). Myši s vymazaným genem *Bax* vykazovaly nárůst buněčné populace u některých typů buněk, například u lymfocytů nebo některých typů neuronů (Brady et al., 1996).

Role mitochondrií v apoptóze

Apoptóza může být indukována dvěma hlavními cestami, přes receptor Fas/CD95 nebo skrze mitochondriální dráhu. Mitochondrie jsou velmi dynamické buněčné organely, které zásobují buňku energií v podobě ATP produkovaného oxidativní fosforylací. Jejich struktura je neustále přeměňována splýváním a štěpením. Bylo objeveno, že štěpení mitochondrií doprovází apoptózu. Mitochondrie se účastní vnitřní dráhy apoptózy tím, že uvolňují z mezimembránového prostoru rozpustné proteiny jako je cytochrom c, který pak aktivuje kaspázy. Uvolnění těchto proteinů je důsledkem narušení vnější mitochondriální membrány. Tato mitochondriální permeabilizace je regulována rodinou proteinů Bcl-2. Rodina proteinů Bcl-2 se dělí na tři skupiny - proteiny antiapoptotické, proapoptotické a proteiny s homologní doménou BH2. Mezi antiapoptotické proteiny se řadí například Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w a A1/Bfl-1. K proapoptotickým patří Bax, Bak, Bod a podskupina proteinů s doménou BH3, která je zásadní pro interakci antiapoptotickými proteiny, které tak inhibuje, nebo pro interakci s multimerovými Bax a Bad, u kterých stimuluje jejich aktivitu. Právě proteiny Bax a Bad jsou esenciální pro narušení integrity vnější mitochondriální membrány. Aktivace proteinu Bax spočívá v přísně regulovaném sledu kroků, který končí jeho přenosem

z cytosolu do vnější mitochondriální membrány a následnou oligomerizací. Bak je naproti tomu do vnější mitochondriální membrány vmezeřen stále. Bax je u neapoptotických buněk přítomen v cytosolu, ale stále se transportuje mezi cytosolem a OMM. Pokud je přichycen na OMM, může být při interakci s antiapoptotickým Bcl-xL translokován zpět do cytosolu. Bcl-xL a další antiapoptotické proteiny tak udržují hladinu Bax na takové úrovni, aby nedocházelo k jeho oligomerizaci a k tvorbě kanálů, jimiž by se uvolňoval cytochrom c. Integrace Bax do OMM je navozena jeho konformační změnou, ke které dochází při kontaktu s OMM. Jakmile je oligomerizace iniciována, spouští se samo-oligomerizace stovek molekul Bax. Pro kompletní aktivaci Bax je také důležitý tvar a lipidické složení OMM. Přítomnost kardioloipinu je nezbytná pro oligomerizaci Bax. Kardiolipin je negativně nabitý fosfolipid a nachází se především ve vnitřní mitochondriální membráně, ale v místech kontaktu vnější a vnitřní membrány je přítomen i ve vnější membráně. Distribuce Bax a jeho oligomerů je na OMM nerovnoměrná a právě v místech kontaktů OMM a IMM je jeho přítomnost nejčastější (Martinou et al., 2011).

Mitochondrie jako dynamické organely neustále fúzují a rozpadají se. Právě konstantní štěpení mitochondrií bylo popsáno během apoptózy. V tomto mechanismu se uplatňuje protein Drp1, ale jeho účast není pro štěpení nezbytná, jeho inhibicí dochází jen ke zpomalení rozdělení mitochondrií. Klíčovou roli proces rozpadu a fúze mitochondrií při apoptózy dokládají i pokusy, kdy inhibicí rozpadu nebo stimulací fúze mitochondrií došlo ke zpomalení apoptózy. Zabráněním rozpadu mitochondrií dochází ke zpomalení uvolňování cytochromu c, protože nedochází k remodelaci mitochondriálních krist, jež je pro pro uvolnění cytochromu c důležitá. Role proteinů rodiny Bcl-2 v mitochondriální dynamice byla prokázána i u zdravých buněk, kdy například zvýšená exprese Bcl-xL indukovala mitochondriální fúzi. Přestože mají proapoptotické proteiny Bax nebo Bak opačnou funkci na apoptózu, jsou nezbytné pro normální rychlost mitochondriální fúze. (Martinou et al., 2011).

Reaktivní kyslíkové radikály

Reaktivní kyslíkové radikály jsou produkty normálního metabolismu nebo vystavení xenobiotik. V závislosti na jejich koncentraci mohou být pro buňky prospěšné nebo škodlivé. Za nízkých fyziologických koncentrací mají význam v nitrobuněčné signalizaci, zatímco jejich zvýšené množství způsobuje oxidativní poškození buněčných makromolekul, inhibici funkce proteinů, případně buněčnou smrt. Vzrůst koncentrace ROS nebo pokles koncentrace antioxidantů může vyústit v nevratné poškození proteinů, lipidů nebo DNA. Tato poškození mohou být příčinou apoptózy a mnoha patologií na úrovni tkání, orgánů nebo orgánových soustav. Mezi reaktivní kyslíkové radikály se řadí od kyslíku odvozené volné radikály:

superoxidový, hydroxylový, peroxylový nebo alkoxylový anion nebo molekula peroxid vodíku. 1-2 % spotřebovaného kyslíku v mitochondriích připadá na produkci ROS. Mezi nejvýznamnější producenty superoxidového aniontu a peroxidu vodíku patří enzymové komplexy Krebsova cyklu, α -ketoglutarát dehydrogenáza a pyruvát dehydrogenáza (Circu et al., 2010; Starkov et al., 2004).

Produkce kyslíkových radikálů v mitochondriích je důležitá z hlediska oxidativního poškození buňky. Tyto kyslíkové radikály jsou zodpovědné za retrográdní redoxní signalizaci z mitochondrií do jádra a cytosolu. Jedním z hlavních kyslíkových radikálů je superoxidový anion $O_2^{\cdot-}$, jenž je produkován v matrix mitochondrií a jehož tvorba souvisí s koncentrací elektronových donorů, kyslíku a rychlostních konstant reakcí mezi nimi. Produkce $O_2^{\cdot-}$ závisí na protonmotivní síle, poměru mezi $NADH/NAD^+$ a $CoQH_2/CoQ$ a na koncentraci O_2 . V mitochondriích je $O_2^{\cdot-}$ vytvářen jedoelektronovou redukcí O_2 . V nasyceném vodném pufru je při teplotě 37 ° C koncentrace kyslíku přibližně 200 μM , mitochondrie *in vivo* jsou však vystaveny mnohem menší koncentraci O_2 , která je dána hlavně extracelulární koncentrací O_2 , kterou ovlivňuje lokální distribuce a spotřeba v závislosti na fyziologických podmínkách. V mitochondriích tak koncentrace kyslíku klesá na 3-30 μM . Za většiny podmínek malé elektronové přenašeče jako $NADH$, $NADPH$, $CoQH_2$ a glutathion nereagují s kyslíkem za tvorby $O_2^{\cdot-}$. Místo toho se $O_2^{\cdot-}$ tvoří na prostetických skupinách proteinů nebo v případě, že jsou elektronové přenašeče jako $CoQH_2$ na tyto proteiny navázány. Mezi faktory určující rychlost produkce $O_2^{\cdot-}$ patří jednak koncentrace proteinu, který nese elektronové přenašeče schopné reagovat s O_2 za tvorby $O_2^{\cdot-}$, a také podíl tohoto elektronového přenašeče v redoxním stavu, kdy dochází k reakci s O_2 . Koncentrace enzymu zodpovědná za tvorbu $O_2^{\cdot-}$ se liší v závislosti na organismu, tkáních, věku nebo koncentraci hormonů. Produkce $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 u izolovaných mitochondrií vzrůstá, pokud i koncentrace O_2 vzrůstá nad atmosferických 21 %. Vedle toho pokles atmosferické koncentrace O_2 způsobuje snížení tvorby $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 . Zvyšující se nebo snižující se rychlost spotřeby O_2 v mitochondriích v závislosti na momentálních fyziologických podmínkách je tedy důležitým faktorem ovlivňujícím produkci $O_2^{\cdot-}$ (Murphy, 2009).

Peroxidace lipidů

Peroxidace lipidů je předmětem výzkumu mnoha laboratoří z důvodu jejich účasti v regulaci buněčného metabolismu, apoptózy nebo signalizace. Lipidy jsou oxidovány různými mechanismy s rozdílnými produkty; enzymatickou oxidací, neenzymatickou oxidací volnými radikály a neenzymatickou oxidací bez účasti volných radikálů. Náchylnost lipidů k oxidaci závisí na reakčních podmínkách a na jejich struktuře. Hydroxyperoxyidy lipidů jsou

primární produkty oxidace a mohou vstupovat do dalších sekundárních enzymatických reakcí. Z hlediska oxidativního stresu *in vivo* je významná oxidace volnými radikály nebo neenzymatická neradikálová oxidace singletovým kyslíkem nebo ozonem. Na enzymatické oxidaci se podílí lipooxygenázy a cyklooxygenázy. Z enzymatické oxidace je významná oxidace lipidů s kyselinou linolovou, která je nejhojnější polynenasycenou kyselinou *in vivo*. Oxidací linoleátu lipooxygenázou vznikají stereomery a enantiomery oktadekadienátů. Lipooxygenázy také procházejí vlastní inaktivací, kdy uvolňují železo, které spouští peroxidaci lipidů volnými radikály (Niki et al., 2005).

Peroxidace polynenasycených mastných kyselin volnými radikály probíhá několika způsoby; reakcí lipidu s molekulárním kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu, fragmentací peroxylového radikálu za vzniku kyslíku a lipidového radikálu, přeuspořádáním peroxylového radikálu nebo cyklizací peroxylového radikálu. Produkty oxidace cholesterolu, oxysteroly, jsou známkou oxidativního stresu. Tyto produkty narušují syntézu žlučových kyselin, signalizaci nebo transport cholesterolu. Cholesterol je oxidován v buňce enzymaticky i neenzymaticky. Na enzymatické oxidaci se podílejí izoformy cytochromu P450, produktem jsou specifické hydroxycholesteroly. Singletový kyslík oxiduje cholesterol neenzymatickou a neradikálovou cestou za vzniku 5- α -hydroxycholesterolu. Indikátorem oxidace volnými radikály je pak 7- α a 7- β -hydroxyperoxycholesterol. Oxysteroly se nacházejí *in vivo* v různých esterifikovaných, sulfatovaných nebo konjugovaných formách a i jako volné oxysteroly. Nasycené a nenasycené mastné kyseliny jsou mnohem méně náchylné k oxidaci volnými radikály (Niki et al., 2005).

Citlovost mastných kyselin k oxidaci roste s počtem dvojných vazeb v uhlíkové kostře. (Cosgrove et al., 1987). Jelikož důsledkem peroxidace lipidů je řada poruch a nemocí, jako bioindikátory posouzení oxidativního stresu *in vivo* se používají isoprostany a neuroprostany, které vznikají oxidací arachidonátu a dokozaheptaenoátu volnými radikály. Redukce lipidických hydroxyperoxidů je důležitá pro zabránění další oxidace a rozkladu například buněčných membrán a také k zachování regulované buněčné signalizace. Buňky disponují antioxidačními enzymovými systémy pro redukci lipidických hydroxyperoxidů. Tyto systémy se liší lokalizací a substrátovou specifitou. Enzymy obsahující selenocystein se řadí mezi nejvýznamnější (Brigelius-Flohé et al., 2003).

Antioxidanty se podílí na ochraně před oxidanty, na útlumu a odstranění aktivních oxidantů a na vyloučení toxických produktů oxidace. Mechanismus spočívá v inhibici enzymatické oxidace lipidů nebo v inhibici řetězové reakce. Aktivita antioxidantů *in vivo* je určena jejich reaktivitou s radikály, absorpcí, distribucí a reakcí s jinými antioxidanty. Mezi hydrofobní antioxidanty patří vitamin E, který je součástí membrán a lipoproteinů, a

hydrofilní vitamin C, který vycytává radikály ve vodném prostředí a regeneruje vitamin E (Niki et al., 2004).

Karbonylace proteinů

Karbonylace proteinů je nevratné oxidativní poškození vedoucí ke ztrátě funkce proteinů. Mírně karbonylované proteiny jsou ještě degradovány v proteazomu, naproti tomu silně karbonylované proteiny vytvářejí vysokomolekulární agregáty, které v proteazomu degradovány být nemohou. Různé neurodegenerativní poruchy jsou způsobeny shlukem těchto špatně složených proteinů odolných k degradaci. Zvýšená produkce kyslíkových radikálů enzymatickou nebo neenzymatickou cestou je způsobena akutním oxidativním stresem a může vyústit v apoptózu nebo nekrózu (Dalle-Donne et al., 2006).

Buněčné cíle oxidativního stresu se liší v závislosti na buněčném typu, míře a délce oxidativního poškození a na místě vzniku (intracelulární/extracelulární). Proteiny jsou hlavním cílem kyslíkových radikálů a druhotně také produkty oxidativního stresu, neboť jsou hlavními komponentami buňky a jsou cílem 50-75 % kyslíkových radikálů. Některé modifikace způsobené ROS mají za následek defekt ve skládání proteinu do správné struktury. Některé reverzibilní modifikace proteinů jako je S-glutathionylace nebo S-nitrozace mohou chránit před nevratným poškozením proteinu (Dalle-Donne et al., 2006).

Ke karbonylaci proteinů může docházet přímo reakcí ROS s proteinem nebo nepřímo s cukry a lipidy. Reakcí ROS s cukry a lipidy vznikají reaktivní karbonylové radikály, které pak druhotně reagují s proteiny. Přímou oxidací proteinů ROS vznikají vysoce reaktivní karbonylové deriváty vycházející z oxidace lysinových, argininových nebo threoninových zbytků za katalýzy kovovými ionty. Dochází také k oxidaci glutamylových zbytků nebo ke štěpení peptidických vazeb alfa-amidací. Glutamát semialdehyd jako produkt oxidace argininu, prolinu, a aminoadipát semialdehyd, produkt oxidace lysinu, jsou hlavními karbonylovými produkty v kovy katalyzovaných oxidacích proteinů. Karbonylové skupiny na proteinech se tvoří sekundárně na amino skupině lysinu s karbonylovými deriváty reakcí s redukujícími cukry nebo jejich oxidačními produkty. Karbonylové skupiny mohou být do proteinu zaváděny také reakcí s oxidovanými lipidy, které vznikly oxidací polynenasycených mastných kyselin (Requena et al., 2001).

Karbonylace proteinů je tedy nejrozšířenějším bioindikátorem oxidativního poškození proteinů a odráží tak buněčné poškození způsobené ROS. Citlivost ke karbonylaci se u různých proteinů liší. Například superoxiddismutáza 1 je jedním z hlavních cílů oxidativního poškození mozku u pacientů trpících Alzheimerovou nebo Parkinsonovou chorobou. Pouze však jedna ze čtyř izoform superoxiddismutázy je silně karbonylována. Náchylnost proteinů

ke karbonylaci je dána přítomností vazebných míst pro kovové ionty. Kovové ionty jsou zdrojem volných radikálů, které iniciují kaskádu reakcí, která skončí tvorbou karbonylových skupin na aminokyselinových zbytcích (Jana et al., 2002).

Pro selektivitu ke karbonylaci hraje roli také konformace, míra produkce a degradace proteinu a četnost aminokyselinových zbytků podléhajících oxidaci. Kromě toho jsou některé proteiny karbonylovány více, protože jsou v blízkosti místa produkce ROS. Mezi takové patří například proteiny Krebsova cyklu nebo elektrotransportního řetězce. Často karbonylované proteiny jsou také stresu odolné Hsp60 a Hsp70 a enzymy glykolýzy. Důležité je, že karbonylované proteiny akumulované během stárnutí buňky nejsou zděděny dceřinými buňkami během cytokineze. Inaktivace proteinů karbonylací je zhoubná, protože buňky nedisponují mechanismy na jejich opravu. Buňky s velkým množstvím karbonylovaných proteinů mají proteazomy a chaperony neschopné degradovat a do správné konformace skládat oxidativně poškozené proteiny (Aguilaniu et al., 2003). Mnoho proteinů translatovaných v buňce je určeno pro sekreci do extracelulárního prostředí. Tyto proteiny jsou z ribozomu nejprve translokovány do endoplazmatického retikula, kde dochází ke skládání do správné konformace a k posttranslačním modifikacím. Zvýšená produkce ROS a následná karbonylace chaperonů negativně ovlivňuje kontrolu kvality exocytovaných proteinů, a to v důsledku narušuje buněčnou funkci. Proteiny s tendencí tvorby špatně složených konformací tvoří amyloidní plaky v buňce nebo v extracelulárním prostředí. Jejich počet vzrůstá s věkem, se zvýšeným oxidativním stresem a se sníženou účinností chaperonů (Dalle-Donne et al., 2006).

Karbonylace není jen nežádoucí proces poškození proteinů. Jedním z příkladů uplatnění mechanismu karbonylace v buněčné regulaci je karbonylace proteinu IRP2, který váže železo a reguluje jeho metabolismus. Pokud je železa v buňce nedostatek, IRP2 je stabilní a aktivní. Při nadbytku železa IRP2 železo naváže, dojde k oxidativní modifikaci a k zavedení karbonylových skupin do jeho struktury. Tato modifikace pak iniciuje ubiquitylaci a degradaci IRP2 v proteazomu (Iwai et al., 1998).

Karbonylované proteiny jsou buď proteolyticky degradovány, nebo se akumulují jako poškozené nebo špatně složené. Mezi hlavní proteolytické systémy patří lyzozomální proteázy, na vápníku závislé proteázy a multikatalytické proteázy jako je 20S proteazom a 26S proteazom s větší aktivitou. Většina proteinů v buňce je degradována v proteazomu 26S po označení ubiquitinem. Většina karbonylovaných proteinů je však degradována v proteazomu 20S, který na rozdíl od proteazomu 26S nevyžaduje ATP a označení ubiquitinem. Proteazom 20S rozeznává hydrofobní části oxidovaných protein, jelikož jsou částečně nebo špatně složené. Přestože střední míra karbonylace proteinů zvyšuje jeho degradaci v

proteazomu, vysoká intenzita karbonylace a propojení je činí odolnými k proteolytické degradaci, protože změněná struktura těchto agregátů neumožňuje interakci s katalytickými místy proteazomu. Aktivita proteazomu s věkem klesá, protože je progresivně inhibován vazbou zvýšeného množství oxidovaných a překřížovaných proteinových agregátů (Grune et al., 2004). Proteazom hraje významnou roli v odstraňování karbonylovaných proteinů během různých patologií, například po ischemii srdce. Post-ischemická inhibice proteazomu 20S koreluje se vzrůstajícím množstvím karbonylovaných proteinů, zatímco post-ischemická inhibice proteazomu 26S vede k akumulaci ubiquitinylovaných proteinů. Například aktin je po ischemii myokardu karbonylován a odstraněn v proteazomu 20S. Zvýšené množství karbonylovaných proteinů bylo pozorováno i v mozku osob se středním kognitivním poškozením, které předchází Alzheimerově chorobě. Oxidativní poškození je tedy jednou z časných událostí v propuknutí a progresi Alzheimerovy choroby. Dalším příkladem je studie na mladých pacientech trpících diabetes mellitus 1, u kterých bylo množství karbonylovaných proteinů v plasmě mnohem vyšší než u jejich zdravých vrstevníků. U diabetických pacientů s mikrocévními komplikacemi byly hladiny karbonylovaných proteinů oproti pacientům bez komplikací zvýšeny. Karbonylace tedy hraje roli v patogenezi komplikací souvisejících s diabetem. Přestože význam karbonylovaných proteinů v patogenezi různých onemocnění zůstává rozhodně jasný, z experimentů vyplývá souvislost při vývoji dlouhodobých komplikací diabetu a nemocí souvisejících s věkem, například aterosklerózou, neurálními dysfunkcemi nebo retinopatií (Martin-Gallan et al., 2003; Dalle-Donne et al., 2006).

Farmakologickými postupy proti karbonylaci proteinů lze zabránit patologickým důsledkům. K vlastnostem terapeutických látek patří přítomnost silného nukleofilního centra schopného reagovat s od glukózy nebo lipidů odvozenými RCS rychleji než proteiny. Tím dojde k inhibici karbonylace proteinů a k zamezení souvisejících patologií (Dalle-Donne et al., 2006).

Hypoxie a role CoCl₂

Hypoxie je nedostatek O₂ pro metabolismus. Jedná se o kritický podnět v mnoha fyziologických a patofyziologických stavech. Hypoxií indukovaná buněčná smrt je například jednou z příčin ischemického poškození tkání nebo komplikací při transplantaci orgánů. Buněčná smrt v důsledku hypoxie je úzce spjata s produkcí ROS, které poškozují buněčné komponenty. Buňky reagují na hypoxii regulací exprese řady genů, například pro erythropoetin, vaskulární endoteliální růstový faktor nebo pro glykolytické enzymy. Regulace exprese těchto genů je zprostředkována proteiny z rodiny HIF. Hypoxií indukovatelný faktor (HIF) aktivuje expresi genů, které obsahují na hypoxii reagující elementy (HREs). V normoxii

jsou α podjednotky transkripčních faktorů HIF degradovány v proteazomu, zatímco při hypoxii dochází k jejich stabilizaci. Protein von Hippel-Lindau (VHL) zprostředkovává ubiquitinylaci a degradaci α podjednotek HIF transkripčních faktorů. Pro interakci mezi HIF a VHL je nezbytná hydroxylace na prolinu α podjednotky HIF, tato reakce je závislá na O_2 . Mechanismus napodobení hypoxických podmínek $CoCl_2$ spočívá v tom, že se váže na VHL, zabraňuje tak interakci mezi VHL a HIF- α a tím brání degradaci HIF- α (Yuan et al., 2003).

Experimenty s buněčnou linií PC12 ukázaly, že $CoCl_2$ v závislosti na koncentraci a době působení spouští apoptózu. Apoptóza byla detekována na základě fragmentace DNA a poklesu exprese Bcl-xL. Produkce ROS byla po aplikaci $CoCl_2$ zvýšena, přičemž antioxidanty indukci apoptózy zablokovaly.

Životaschopnost buněk byla po 36 h působení $CoCl_2$ v rozsahu koncentrací 100-1000 μM snížena v závislosti na zvyšující se koncentraci $CoCl_2$. Koncentrace 500 μM snižovala životaschopnost v závislosti na čase, přičemž přibližně 50 % úmrtnost nastala po 24 h. V porovnání s buněčnými liniemi HeLa nebo LoVo jsou PC12 buňky k $CoCl_2$ citlivější. Aplikace $CoCl_2$ vyvolávala pro apoptózu typickou kondenzaci a fragmentaci jader. Intenzita fragmentace DNA byla také závislá na zvyšující se koncentraci v rozsahu 100-500 μM . Potvrdilo se, že pro indukci apoptózy působením $CoCl_2$ je nezbytná transkripce mRNA a translace proteinů. Použití inhibitoru syntézy RNA, aktinomycinu D, a inhibitoru translace, cykloheximidu, inhibovalo $CoCl_2$ indukovanou apoptózu. Badatelé zjistili, že působení $CoCl_2$ v koncentraci 500 μM po dobu 24 h snižuje expresi Bcl-xL. Nezjistili žádnou změnu v expresi Bax. AP-1 je transkripční faktor, který hraje nezbytnou roli v odpovědi na oxidativní stres a v signalizaci apoptotických procesů. Po aplikaci $CoCl_2$ byla demonstrována zvýšená DNA vazebná aktivita proteinu AP-1. Antioxidanty blokovaly i tuto zvýšenou aktivitu (Zou et al., 2001).

Cíle diplomové práce

1. Pomocí metod SDS-PAGE a Western blotingu zjistit, zda v závislosti na zvyšující se koncentraci LPI, Rimonabantu, O-1602, 2-AG dochází k fosforylaci proteinkináz ERK 1/2 a Akt (PKB) a zda dochází k inhibici indukované fosforylace inverzním agonistou GPR55 CID-16020046.
2. Pomocí metod SDS-PAGE a Western blotingu zjistit, zda v závislosti na zvyšující se koncentraci LPI, Rimonabantu, O-1602, 2-AG dochází k aktivaci GTPázy RhoA a zda dochází k inhibici aktivace inverzním agonistou GPR55 CID-16020046.
3. Pomocí metod SDS-PAGE a Western blotingu zjistit, zda $CoCl_2$, jednotlivé ligandy GPR55 a jejich kombinace indukují nebo snižují expresi proteinů Bax, Bcl-xL.

4. Pomocí kolorimetrických metod zjistit, zda CoCl_2 , jednotlivé ligandy GPR55 a jejich kombinace indukují karboxylaci proteinů nebo peroxidaci lipidů.

Materiál a metody

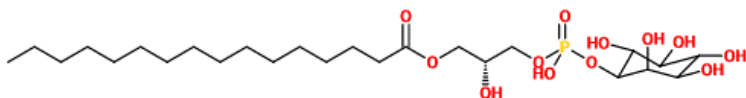
Kultivace buněk

Buněčná linie PC12 od společnosti Sigma se uchovávala v kapalném dusíku o teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mikrozkuřkách v 1 ml živného média RPMI-1640 (Sigma) s 10% obsahem DMSO. DMSO omezovala tvorbu ledových krystalů, které buňky poškozují během zmrazení a rozmrazení. Po vyjmutí z kapalného dusíku se mikrozkuřka ohřála vodou o teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po viditelném přechodu obsahu mikrozkuřky do kapalného skupenství se roztok média s DMSO a buňkami odebral pipetou ve sterilním boxu do 15ml nebo 50ml falkony. Obsah falkony se nechal okamžitě centrifugovat 3 minuty při tíhovém zrychlení 150 g. Další postup probíhal opět ve sterilním boxu. Po centrifugaci byly buňky přichyceny na dně falkony a vrchní roztok se opatrně odebral pipetou. K buňkám se přidalo 9 900 μl média RPMI-1640, které obsahovalo 10 % koňského séra (HS) a 5 % FBS, a 100 μl antibiotika AAS. Výsledná koncentrace antibiotik během růstu byla 1 %. Médium muselo být předem nahřáto na teplotu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antibiotika uchovávané v mrazničce při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se nechala rozmrazit. Poté, co bylo ve falkoně 10 ml média s antibiotiky, se buňky resuspendovaly opatrným nasáváním a vypouštěním z pipety. Takto resuspendované buňky se vpravily do ploché sterilní plastové lahve o objemu 250 ml. Jelikož PC12 buňky měly silnou tendenci vytvářet shluky, bylo vhodné vypouštět obsah pipety o stěnu lahve tak, aby došlo k co nejhomogennější distribuci buněk v rámci lahve. Lahev byla vložena do kultivačního boxu, kde byla teplota $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 5% koncentrace CO_2 . Podle potřeby a rychlosti růstu se buňkám třikrát až čtyřikrát za týden měnilo médium nebo se pasážovaly do dalších lahví. Protože buňky PC12 nebyly kultivovány na lahvích potažených kolagenem nebo poly-L-lysinem, rostly jako suspenzní. Z tohoto důvodu se při výměně nepoužíval roztok trypsinu, ale roztok média s buňkami se opět odebral do sterilní falkony, buňky se nechaly centrifugovat 3 minuty při zatížení 150 g, buňky zůstaly přichycené na dně falkony a použité médium se odebralo. K buňkám se přidalo 10 ml média, buňky se resuspendovaly a roztok se zpět vložil do kultivační lahve. Při pasážování se používal obdobný postup, rozdíl byl v tom, že se buňky necentrifigovaly, pouze se 5 ml přeneslo do druhé kultivační lahve a k původní i druhé kultivační lahvi se přidalo 5 ml nového média.

Použité ligandy

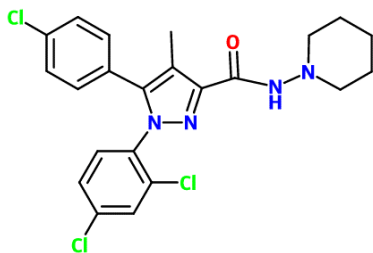
Při práci se používalo pět ligandů:

LPI (sodná sůl L- α -lysofosfatidylinositolu, Sigma - L- α -Lysophosphatidylinositol sodium salt from soybean)



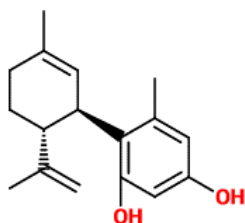
- $M_r = 376,08 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, rozpustnost: v DMSO, skladování při teplotě -20°C
- Byl připraven 10 mM a 1 mM roztok LPI v DMSO. Pro přípravu 10 mM roztoku LPI bylo k 1 mg LPI přidáno 266 μl DMSO. Rozpouštění proběhlo snadno a rychle bez nutnosti zahřívání. 1mM roztok byl připraven smícháním 50 μl 10 mM LPI a 450 μl DMSO.

Rimonabant (SR141716) (Rimonabant hydrochloride – Sigma)



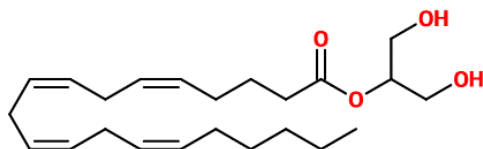
- $M_r = 500,25 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, rozpustnost: v DMSO, skladování při teplotě $4 - 8^\circ\text{C}$
- Byl připraven 10 mM a 1 mM roztok Rimonabantu v DMSO. Pro přípravu 10 mM roztoku Rimonabantu bylo k 5 mg Rimonabantu přidáno 999,5 μl DMSO. 1 mM roztok byl připraven smícháním 50 μl 10 mM Rimonabantu a 450 μl DMSO.

O-1602 (Tocris)



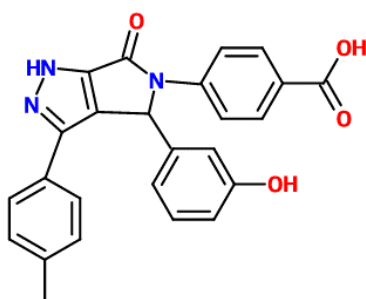
- $M_r = 258,36 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, rozpustnost: v DMSO, skladování při teplotě -20°C
- Produkt je dodáván rozpuštěn v koncentraci 10 mg/ml, $c = 37,7 \text{ mM}$. Pro přípravu 1mM roztoku bylo smícháno 26,31 μl O-1602 a 973,3 μl DMSO.

2-AG (Tocris)



- $M_r = 378,55 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, skladování při teplotě -80°C
- 10 mg 2-AG bylo rozpuštěno do koncentrace 100 mM. K 10 mg 2-AG bylo přidáno 264,2 μl DMSO. 1 mM roztok byl připraven smícháním 5 μl 100 mM roztoku a 495 μl DMSO.

CID-16020046 (Tocris)



- $M_r = 425,44 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, rozpustnost: v DMSO, skladování při teplotě 4°C
- 10 mg CID-16020046 bylo rozpuštěno v 235 μl DMSO, vznikl tak 100 mM roztok.

Fosforylace

Pro měření úrovně fosforylace buněčných kináz byly ligandy aplikovány k buňkám v koncentračním rozmezí 0,1 – 100 μM po dobu 10 minut. Nejprve byly buňky centrifugovány 3 minuty při tíhovém zrychlení 150 g. Poté byly resuspendovány v 5 ml média RPMI-1640 s obsahem 2 % HS a 1 % FBS. Účinky předpokládaných agonistů receptoru byly zkoumány v kombinaci s aplikací inverzního agonisty CID-16020046. Do jednotlivých kultivačních lahví byly přidány ligandy dle následujících tabulek:

Tab. 1: Tabulky ředění ligandů na požadovanou koncentraci:

LPI					
Výsledná koncentrace ligandu	0,1 μM	1 μM	10 μM	100 μM	10 μM + 10 μM CID-16020046
Celkový objem média RPMI-1640	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Koncentrace zásobního roztoku ligandu	1 mM	1 mM	1 mM	10 mM	1 mM + 100 mM CID-16020046
Objem přidávaného ligandu	0,5 μl	5 μl	50 μl	50 μl	50 μl + 0,5 μl CID-16020046

Rimonabant					
Výsledná koncentrace ligandu	0,1 µM	1 µM	10 µM	100 µM	10 µM + 10 µM CID-16020046
Celkový objem média RPMI-1640	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Koncentrace zásobního roztoku ligandu	1 mM	1 mM	1 mM	10 mM	1 mM + 100 mM CID-16020046
Objem přidaného ligandu	0,5 µl	5 µl	50 µl	50 µl	50 µl + 0,5 µl CID-16020046

O-1602					
Výsledná koncentrace ligandu	0,1 µM	1 µM	10 µM	100 µM	10 µM + 10 µM CID-16020046
Celkový objem média RPMI-1640	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Koncentrace zásobního roztoku ligandu	1 mM	1 mM	1 mM	37,7 mM	1 mM + 100 mM CID-16020046
Objem přidaného ligandu	0,5 µl	5 µl	50 µl	13,3 µl	50 µl + 0,5 µl CID-16020046

2-AG					
Výsledná koncentrace ligandu	0,1 µM	1 µM	10 µM	100 µM	10 µM + 10 µM CID-16020046
Celkový objem média RPMI-1640	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Koncentrace zásobního roztoku ligandu	1 mM	1 mM	1 mM	100mM	1 mM + 100 mM CID-16020046
Objem přidaného ligandu	0,5 µl	5 µl	50 µl	5 µl	50 µl + 0,5 µl CID-16020046

CID-16020046				
Výsledná koncentrace ligandu	0,1 µM	1 µM	10 µM	100 µM
Celkový objem média RPMI-1640	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Koncentrace zásobního roztoku ligandu	1 mM	1 mM	1 mM	100mM
Objem přidaného ligandu	0,5 µl	5 µl	50 µl	5 µl

Buňky byly po aplikaci ligandů uloženy do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Po deseti minutách byly buňky z jednotlivých lahví odpipetovány do 15ml falkon a centrifugovány 3 minuty při tíhovém zrychlení 150 g. Médium s ligandy bylo odebráno a k buňkám byl napipetován PBS. Buňky byly resuspendováním v PBS promyty a opět centrifugovány 3

minuty při 150 g. Po centrifugaci byl PBS odpipetován a do jednotlivých falkon bylo napipetováno 250 µl ledového lyzačního pufru:

Tab. 2: Složení lyzačního pufru pro detekci fosforylace pomocí imunoblotingu

Objem 50 ml, pH 7,5	Koncentrace	Množství
EDTA	1 mM	14,6 mg
EGTA	1 mM	19 mg
Triton X-100	1 %	0,5 ml
NaCl	150 mM	438 mg
Tris	20 mM	121 mg
Směs inhibitorů proteáz („complete protease inhibitor cocktail“ – Sigma)	2 % (Přidává se jako čerstvý těsně před použitím)	5 µl do 250 µl
Směs inhibitorů fosfatáz (koktejl č. 1 a č. 2 – Sigma)	0,5 % (Přidává se jako čerstvý těsně před použitím)	1,25 µl do 250 µl
NaF	30 mM	63 mg

Buňky byly v tomto lyzačním pufru nejprve resuspendovány. Pak byly přepipetovány do 1,5ml mikrozkupek. Mikrozkupek byly vloženy do ledu, inkubace probíhala 30 minut. Každých 10 minut byly jemně vortexovány. Po 30 minutách se lyzáty centrifugovaly při teplotě 4 °C a tíhovém zrychlení 1000 g. Postnukleární supernatant byl přepipetován do nových 1,5ml mikrozkupek. Supernatant byl uchován v mrazáku při teplotě – 80 °C.

WST-1 test

Pro testování životaschopnosti buněk byl použit test WST-1. Jedná se o kolorimetrické stanovení buněčné metabolické aktivity. WST-1 test patří do skupiny kolorimetrických analýz MTT. Princip spočívá v tom, že na NADH závislé buněčné oxidoreduktázy jsou schopné redukovat tetrazoliové soli na nerozpustný formazan, který je fialově zbarvený. WST-1 test využívá ve vodě rozpustnou tetrazoliovou sůl, (2-(4-Iodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H, která neproniká buněčnou membránou. Redukce na formazan tedy probíhá v extracelulárním prostředí. Množství formazanu a tedy intenzita fialového zbarvení koreluje s metabolickou aktivitou a s životaschopností buněk.

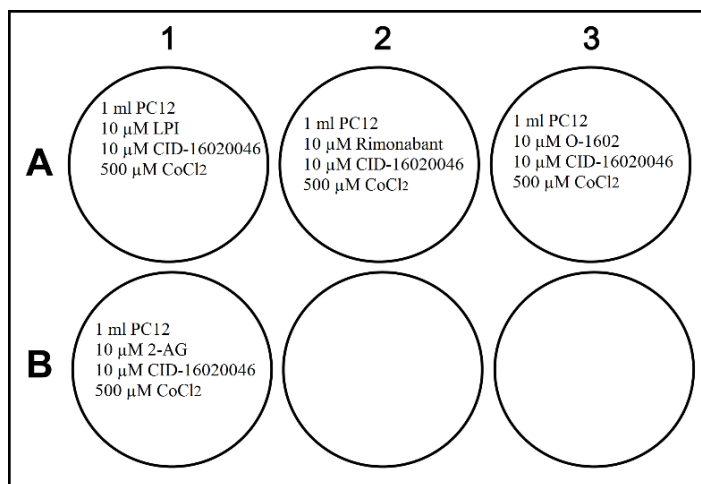
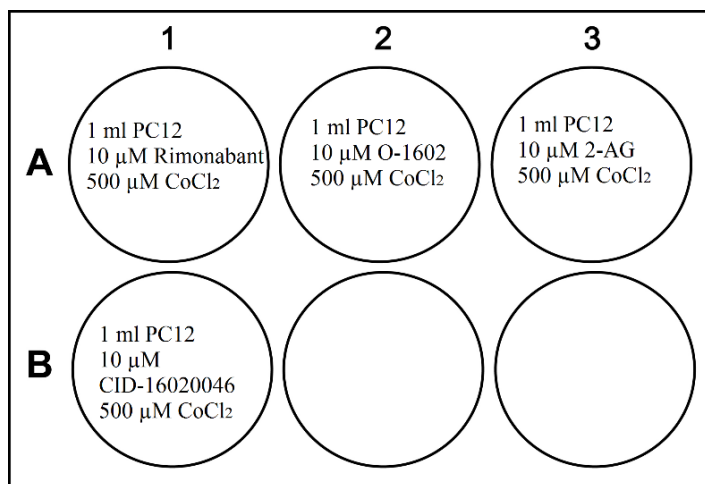
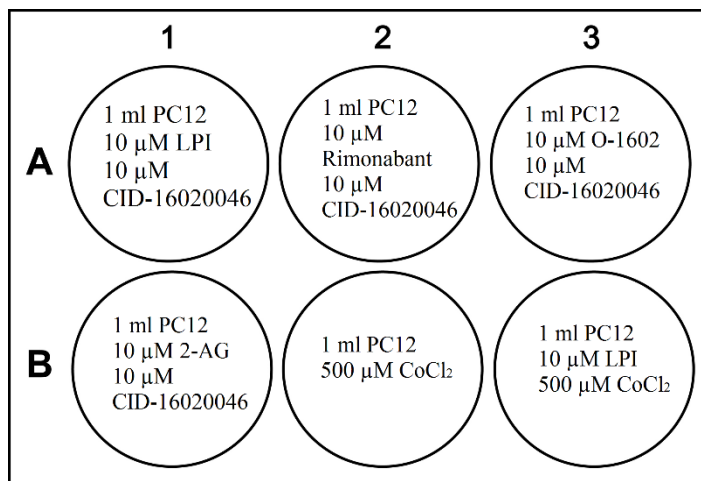
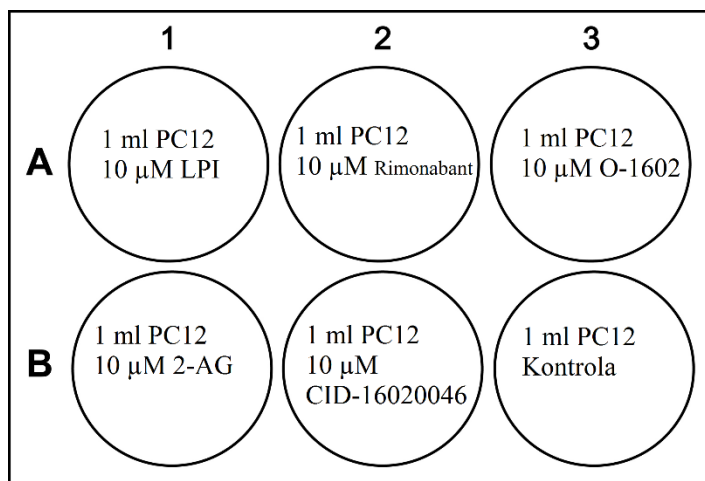
Pro stanovení koncentrace CoCl₂, při které umírá přibližně 50 % buněk po 24 h, byl následující postup:

1. Do kultivačních lahví s buňkami byl aplikován CoCl₂ v koncentracích 0, 200, 400, 600, 800 a 1000 µM. Bylo použito médium se sníženým množstvím séra (RPMI-1640, 2 % HS, 1 % FBS)

2. Tyto lahve byly v inkubátoru 24 h při teplotě 37 °C, 5 % CO₂
3. Do 96 jamkové destičky bylo napipetováno 90 µl buněk a 10 µl roztoku WST-1
4. Destička byla inkubována 1 h při 37 °C a 5 % CO₂
5. Absorbance byla změřena spektrofotometrem, přičemž míra absorbance korelovala s počtem životaschopných buněk.

Aplikace ligandů, CoCl₂ a zpracování buněk

Ligandy byly k buňkám aplikovány v 10 µM zvlášť nebo společně s 500 µM koncentrací CoCl₂. Bylo tak testováno, zda má působení jednotlivých ligandů cytoprotektivní nebo naopak apoptotický efekt při hypoxii, kterou simuloval CoCl₂. 10 ml média s buňkami z kultivační lahve bylo centrifugováno 3 minuty při 150 g. Použité médium bylo odebráno a buňky byly resuspendovány v 6 ml čerstvého média RPMI-1640 s 2 % HS a 1 % FBS. Těchto 6 ml buněk bylo po 1 ml rozděleno do šestijamkové sterilní destičky. Do jamek byly přidány ligandy 1 h před aplikací CoCl₂. Kombinace ligandů a koncentrace jsou znázorněny na obrázcích:



Po 24 hodinách byly buňky odpipetovány z jamek do 1,5ml mikrozkupek a centrifugovány 3 minuty při 150 g. Použité médium s ligandy bylo odebráno a k peletě buněk byl napipetován 1 ml PBS. Peleta byla resuspendována a opět centrifugována 3 minuty při 150 g. PBS byl odpipetován a mikrozkupek s peletami byly buď okamžitě zmrazeny v kapalném dusíku a následně uskladněny v mrazáku při teplotě - 80 °C, nebo byly ještě týž den zpracovány. Následující postup s peletami se lišil podle typu experimentu:

1. Analýza exprese proteinů pomocí metod SDS-PAGE elektroforézy a Imunoblotingu (Western blotingu)
2. Analýza intenzity karboxylace proteinů
3. Analýza intenzity peroxidace lipidů

Analýza exprese proteinů pomocí metody imunoblotingu

Buněčné pelety získané postupem popsaným v kapitole „Aplikace ligandů, CoCl₂ a zpracování buněk“ byly po vyjmutí z mrazáku ihned resuspendovány ve 250 µl lyzačního pufru a uloženy na ledu po dobu 30 minut. Každých 10 minut byly jemně vortexovány.

Tab. 3: lyzační pufr pro vzorky na SDS-PAGE elektroforézu

Objem 50 ml, pH 7,5	Koncentrace	Množství
EDTA	1 mM	14,6 mg
EGTA	1 mM	19 mg
Triton X-100	1 %	0,5 ml
NaCl	150 mM	438 mg
Tris	20 mM	121 mg
Směs inhibitorů proteáz („complete protease inhibitor cocktail“ – Sigma)	2 % (Přidává se jako čerstvý těsně před použitím)	5 µl do 250 µl H ₂ O

Po 30 minutách byly lyzáty centrifugovány 5 minut při 1000 g. Postnukleární supernatant byl odpipetován do nových 1,5ml mikrozkupek. Před proběhnutím SDS-PAGE elektroforézy bylo nezbytné změřit koncentraci proteinů.

Stanovení koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorku byla použita biochemická analýza pomocí bicinchoninové kyseliny. Princip spočívá v tom, že měďnatý kation Cu²⁺ je redukován

peptidovými vazbami proteinu na měďný kation Cu^+ . Dvě molekuly bicinchoninové kyseliny (BCA) tvoří chelátový komplex s jedním kationtem Cu^+ . Tento komplex je fialově zbarvený, přičemž intenzita zbarvení přímo úměrně odpovídá množství proteinů v analyzovaném roztoku. Tento fialový komplex silně absorbuje světelné záření o vlnové délce 562 nm. Množství proteinu je určeno z porovnání mezi absorbancí analyzovaných vzorků a absorbancí vzorků o známé koncentraci proteinů. Ke stanovení proteinů byly použity tři roztoky a dva standardy hovězího sérového albuminu (BSA):

Tab. 4: Roztoky a standardy pro stanovení koncentrace proteinů

Roztok A (100 ml)	0,65 M Monohydrát uhličitanu sodného	8 g
	0,08 M Vínan sodný	1,6 g
	pH upraveno na 11,25 pomocí 10 M NaOH	
Roztok B (100 ml)	0,12 M BCA	4 g
Roztok C (100 ml)	0,016 M Pentahydrát síranu měďnatého	0,4 g
BSA standard	C = 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	
BSA standard	C = 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	

Postup práce:

10 μl vzorku bylo v 1,5ml mikrozkuhavce smícháno s 990 μl vody (1:100). Byl připraven pracovní roztok smícháním roztoků A, B a C v poměru 26: 25: 1. Na 96 jamkovou mikrotitrační destičku byla nejprve napipetována koncentrační řada BSA standardů dle tabulky č. 4. Poté bylo do dalších jamek napipetováno 100 μl z naředěného vzorku v triplikátech za sebou. Do všech jamek bylo napipetováno 100 μl pracovního roztoku. Destička byla přelepena speciální fólií, aby nedocházelo během inkubace k vypařování. Následně byla destička inkubována 30 minut při teplotě 60 °C. Po inkubaci byly vzorky analyzovány pomocí spektrofotometru Synergy HT při vlnové délce 562 nm. Vyhodnocení probíhalo v programu Gen5.

Tab. 5: Koncentrační řada standardů BSA pro stanovení kalibrační křivky

Standard č.		BL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$\mu\text{g BSA}$		0	0,2	0,5	1	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50
BSA (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	μl	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	μl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50

SDS-PAGE elektroforetická separace

SDS-PAGE je metoda pro elektroforetickou separaci proteinů. Metoda využívá polyakrylamidového gelu a dodecylsírany sodného (SDS) k separaci proteinů na základě délky polypeptidového řetězce a jejich rozdílné molekulové hmotnosti. Pohyb proteinů v gelu probíhá v elektrickém poli a závisí také na stupni denaturace proteinu a posttranslačních modifikacích. Polyakrylamidový gel vzniká polymerací akrylamidu ($\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$) pomocí N,N-metylenbisakrylamidu. Koncentrace gelu závisí na požadavcích experimentu. Čím menší proteiny je třeba separovat, tím hustší gel je nutné připravit. Pro polymeraci gelu je nezbytný peroxodisíran amonný (APS) jako oxidační činidlo a N, N, N', N'-tetrametyletyldiamin (TEMED), který polymeraci stabilizuje. APS a TEMED je nutné při míchání roztoku gelu přidávat až nakonec. Pro SDS-PAGE se používají dva typy gelů zároveň. Rozdělovací gel má vyšší koncentraci polyakrylamidu a pH 8,8. Na něm nalitý zaostřovací gel má pH 6,8. Princip zaostřování spočívá v tom, že glycin obsažený v elektrolytovém pufru nemá při pH 6,8 náboj a většina jeho molekul je ve formě zwitteriontů. Glycin se tedy v zaostřovacím gelu pohybuje pomaleji než proteiny. Naproti tomu chloridové ionty plní úlohu vedoucího iontu a pohybují se rychleji než proteiny. Tato rozdílná rychlost pohybu glycinu a chloridového iontu umožňuje zakoncentrování proteinů. V rozdělovacím gelu při pH 8,8 získává glycin záporný náboj, ztrácí úlohu terminujícího iontu a proteiny se rozdělují dle své molekulové hmotnosti.

Příprava vzorku

Během přípravy vzorku je nutné proteiny denaturovat v tzv. Laemmliho vzorkovém pufru, který obsahuje SDS, redukční činidlo, např. β-merkaptoetanol, glycerol, bromfenolovou modř a Trisový pufr o hodnotě pH 6,8. SDS je ionogenní detergent který se váže k proteinům v poměru 1,4 g SDS : 1 g proteinu. Obalením proteinu SDS vznikají negativně nabitě částice proteinů, přičemž velikost náboje je přímo úměrná velikosti proteinu. β-merkaptoetanol redukuje disulfidické můstky a napomáhá denaturaci. Glycerol pufr zahušťuje a bromfenolová modř proteiny obarví a umožní tak jejich vizualizaci v gelu v průběhu separace.

Postup práce

Postnukleární supernatant ze vzorků byl smíchán se vzorkovým pufrém a vodou tak, aby pak množství proteinů v jamce gelu bylo 30 μg. Vzorkový pufr s proteiny byl povařen 3 minuty.

Byla sestavena aparatura pro elektroforetickou separaci Mini-Protean 2 (Bio-Rad). Pro přípravu gelů je potřeba plastový stojan, pěnové těsnění, dvě skla a plastová svorka skel. Skla byla pečlivě očištěna etanolem. Namíchané roztoky gelů dle tabulky č. 6 byly napipetovány mezi dvě skla přibližně do dvou třetin jejich výšky. Na gel bylo aplikováno 400 μ l butanolu. Zatímco gel mezi skly polymeroval, byl namíchán zaostřovací gel dle tabulky č. 6. Po 30 minutách polymerace byl odebrán butanol, který zůstal na vrchu, a na rozdělovací gel byl nalit roztok zaostřovacího gelu až k horní hraně skla. Navrch byl do ještě tekutého gelu zasunut deseti nebo patnácti jamkový plastový hřebínek. Doba polymerace zaostřovacího gelu činila 10 – 20 minut. Během polymerace byl připraven elektrolytový „running“ pufr. Po polymeraci byla skla uvolněna z plastové svorky a byla přenesena do plastové vany, do které byl po rysku nalit elektrolytový pufr. Do jedné krajní nebo centrální jamky v gelu byly napipetovány 2 μ l standardu molekulových hmotností. Pro 15% gel byl používán nízkomolekulární standard RPN755-E (GE Healthcare Life Sciences). Pro 10% gel byl použit standard P-1677 (Sigma). Do dalších jamek byly napipetovány vzorky tak, aby v každé jamce bylo 30 μ g proteinu. Vana byla uzavřena víkem a kabely byly zapojeny do zdroje. Elektroforéza probíhala nejprve při 75 V, dokud proteiny nezajely do rozdělovacího gelu. Pak bylo napětí zvýšeno na 150 V. Celková doba separace trvala asi 1 h a 30 minut.

Tab. 6: roztoky pro SDS-PAGE elektroforézu

Pufr č. 1	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	18,17 g Tris-HCl 100 ml H ₂ O
Pufr č. 2	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	6,05 g Tris-HCl 100 ml H ₂ O
30 % akrylamid (w/v)		30 g akrylamidu
0,8 % N,N-metylenbisakrylamid (w/v)		0,8 g N,N-metylenbisakrylamidu 100 ml H ₂ O
10 % SDS (w/v)		10 g SDS 100 ml H ₂ O
10 % APS (w/v)		0,1 g APS 1 ml H ₂ O
TEMED		
Elektrolytový „running“ pufr 10 × koncentrovaný		30,3 g Tris-HCl 141,1 g glycinu 10 g SDS 1000 ml H ₂ O
Laemmliho vzorkový pufr 4 × koncentrovaný		2,4 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8) 1 ml glycerolu 0,8 g SDS 0,8 g DTT nebo 0,4 ml merkaptioetanolu 1 mg bromfenolové modři 10 ml H ₂ O
10 % rozdělovací polyakrylamidový gel (10 ml)		3,4 ml 30%/0,8% akrylamid/bisakrylamid (w/v) 2,6 ml pufru č. 1 (pH 8,8) 3,8 ml H ₂ O 0,1 ml 10 % SDS (w/v) 0,1 ml 10 % APS (w/v) 0,01 ml TEMEDu
15 % rozdělovací polyakrylamidový gel (10 ml)		5 ml 30%/0,8% akrylamid/bisakrylamid (w/v) 2,6 ml pufru č. 1 (pH 8,8) 2,2 ml H ₂ O 0,1 ml 10 % SDS (w/v) 0,1 ml 10 % APS (w/v) 0,01 ml TEMEDu
4 % zaostřovací polyakrylamidový gel (5 ml)		0,67 ml 30%/0,8% akrylamid/bisakrylamid (w/v) 1,25 ml pufru č. 2 2,975 ml H ₂ O 0,05 ml 10 % SDS (w/v) 0,05 ml 10 % APS (w/v) 0,005 ml TEMEDu

Western blotting (imunoblotting)

Western blotting je metoda využívána pro detekci specifického proteinu ze vzorku pomocí protilátek. Po proběhnutí SDS-PAGE elektroforézy jsou proteiny rozdělené v gelu přeneseny („přebloťovány“) na nitrocelulózovou nebo polyvinylidenfluoridovou membránu (PVDF). Přenos probíhá v elektrickém poli. Záporně nabitě proteiny během blotování putují směrem k anodě na membránu. Všechny proteiny na membráně se nespecificky detekují např. roztokem barvy Ponceau. Po promytí membrány v TBST je nutné nespecifická místa na povrchu membrány zablokovat inkubací membrány v roztoku mléka nebo BSA, aby nedocházelo k nespecifické vazbě protilátek na membránu. Blokování membrány výrazně snižuje šum pozadí. Po blokování se přidá primární protilátka, která se váže na epitopy antigenů. Inkubace v primární protilátce probíhá obvykle přes noc. Následuje promytí membrány v TBST a aplikace sekundárních protilátek, které mohou být konjugované např. s křenuvou peroxidázou. Křenuvá peroxidáza katalyzuje oxidaci luminolu na 3-aminoftalát. Během této reakce dochází k emisi světla o nízké intenzitě. Emise může být několikasetnásobně zvýšena přítomností zesilujících chemických látek. Světelná emise, která je přímo úměrná množství proteinu na membráně, je pak detekována např. na fotografickém filmu.

Postup práce:

Po dokončení separace na SDS-PAGE elektroforéze byl gel opatrně vyjmut z aparatury. Do vany pro Western blotting byl nalit blotovací pufr (TGM). Nitrocelulózová membrána a gel byly v TGM pufru vloženy jako sendvič do plastové blotovací mřížky. Tato mřížka byla do vany s pufrem zasunuta tak, aby proud během blotování procházel směrem od gelu na membránu. Vana byla přiklopena víkem a kabely byly zapojeny do zdroje. Přenos proteinů na membránu probíhal při konstantním napětí 80 V po dobu 1 h a 30 minut.

Po skončení přenosu byla membrána opatrně vyjmuta z plastové mřížky a krátce propláchnuta v TBST pufru. Membrána byla následně inkubována v roztoku Ponceau po dobu 5 minut. Poté byla opět krátce propláchnuta v TBST, aby se odbarvilo nespecifické zbarvení membrány. Na membráně byly zřetelné červené pruhy, které reprezentovaly rozdělené proteiny. Membrána byla naskenována a obrázek byl uložen ve formátu TIF. Pak byla propláchnuta v TBST 3 × 5 minut.

Blokování membrány probíhalo 1 h v blokovacím pufru, který obsahoval buď nízkotučné mléko nebo BSA. Blokovací pufr s BSA byl použit při detekci fosforylovaných proteinů, protože mléko obsahuje fosfoprotein kasein, na který by se vázaly protilátky proti fosforylovaným proteinům, a zobrazovalo by se tak vysoké pozadí.

Po blokování byla membrána vložena do ředícího pufru. Primární protilátka byla aplikována podle typu v koncentracích 1:1000 až 1:10 000. Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc při teplotě 4 °C.

Druhý den byla membrána vyjmuta z ředícího pufru s protilátkou a propláchnuta 3 × 10 minut v TBST. Poté byla membrána přenesena do ředícího pufru, do kterého byla napipetována příslušná sekundární protilátka v koncentraci 1:20 000 až 1:40 000. Inkubace probíhala 1 h a 30 minut při pokojové teplotě. Po této době byla membrána opět propláchnuta 3 × 10 minut v TBST a jemně osušena filtračním papírem. Následovalo nanesení chemiluminiscenčního roztoku (Pierce Super Signal, ThermoFisher Scientific) a inkubace 1 minutu. Na membránu byl ve tmě přiložen fotografický film. Doba expozice závisela na typu použité primární protilátky a trvala v rozmezí od 3 s do 24 h. K vyvolání filmu byl použit vyvolávací automat Optimax (Fomei). Film byl pak spolu s naskenovanou obarvenou membránou použit k analýze v programu ImageJ.

Tab. 7: Roztoky pro Western blotting a imunodetekci

TGM blotovací pufr	15 g Tris 72 g glycinu 1000 ml metanolu Doplněno H ₂ O do 5000 ml
TBS pufr, pH 7,6 (upraveno HCl) 10 × koncentrovaný	1,5 M NaCl (87,67 g) 0,2 M Tris (24,23 g) Doplněno H ₂ O do 1000 ml
TBST pufr, pH 7,6	100 ml TBS pufru 10 × koncentrovaného 1 ml Tweenu 899 ml H ₂ O
Blokovací pufr (50 ml)	2,5 g mléka [5 % (w/v)] 50 ml TBST pufru
Ředící pufr (50 ml)	1 g mléka [2 % (w/v)] 50 ml TBST pufru

Tab. 8: Použité protilátky v metodě Western blotting, sekundární protilátky jsou konjugované s křenovou peroxidázou

Protilátka	Výrobce	Ředění
137F5 (ERK 1/2), králík	Cell Signalling	1:10 000
197G2 (p-ERK 1/2), králík	Cell Signalling	1:1000
D9E (p-Akt), králík	Cell Signalling	1:2000
Sc-526 (Bax), králík	Santa Cruz	1:2000
Sc-8392 (Bcl-xL), myš	Santa Cruz	1:2000
Sc-8312 (Akt 1/2/3), králík	Santa Cruz	1:2000
Sc-418 (RhoA), myš	Santa Cruz	1:2000
Anti-rabbit IgG (sekundární)	GE Healthcare	1:40 000
Anti-mouse IgG (sekundární)	GE Healthcare	1:20 000

Kolorimetrické stanovení peroxidace lipidů

Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) poškozují polynenasycené mastné kyseliny. Během reakce vzniká malondialdehyd, který je indikátorem oxidativního stresu. Metoda spočívá ve stanovení absorbance červeno-fialového komplexu, který vzniká reakcí malondialdehydu se dvěma molekulami thiobarbiturové kyseliny. Absorbance je změřena spektrometrem při 532 nm. Hodnota absorbance vzorku odpovídá přímo úměrně množství malondialdehydu, a tedy míře peroxidace lipidů. Jako standard se používá 1,1,3,3-tetrametoxypentan, který je při reakci s vodou konvertován na malondialdehyd.

Postup práce

Buněčné pelety získané postupem popsáním v kapitole „Aplikace ligandů, CoCl_2 a zpracování buněk“ byly zpracovány takto:

1. Bylo připraveno potřebné množství lyzačního pufru s 2% obsahem směsi inhibitorů proteáz („Complete protease inhibitor cocktail“ – Sigma).
2. Do každé 1,5ml mikrokumavky s peletami bylo napipetováno 300 μl lyzačního pufru.
3. Pelety byly postupně dvakrát sonikovány na ledu 20 s při výkonu 80 % a jednou 20 s při výkonu 60 %.
4. Lyzáty byly centrifugovány 10 minut při 3000 g a 4 °C
5. Bylo odebráno 10 μl supernatantu pro stanovení koncentrace proteinů
6. 100 μl lyzátu bylo přepipetováno do nových 1,5ml mikrokumavek.
7. K těmto 100 μl bylo přidáno 200 μl 10% trichloroctové kyseliny
8. Inkubace probíhala 15 minut na ledu.
9. Byla připravena koncentrační řada standardů 1,1,3,3-tetrametoxypentan podle tabulky:

Tab. 9: Koncentrační řada standardů 1,1,3,3-tetrametoxypentan

Mikrokumavka č.	Koncentrace (μM)	H_2O	1,1,3,3-tetrametoxypentan
1	0	500	-
2	0,625	500	500 μl z č. 3
3	1,25	500	500 μl z č. 4
4	2,5	500	500 μl z č. 5
5	5	500	500 μl z č. 6
6	10	800	200 μl z č. 7
7	50	500	500 μl z č. 8
8	100	800	200 μl ze zás. roztoku (500 μM)

10. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 15 minut při 2200 g a 4 °C.
11. 200 µl supernatantu bylo přepipetováno do nových 1,5ml mikrozkušavek.
12. K supernatantu bylo přidáno 200 µl 0,67% thiobarbiturové kyseliny.
13. Mikrozkušavky byly inkubovány 10 minut ve vroucí vodě.
14. Po ochlazení bylo 150 µl standardu v pořadí 1-8 v duplikátech napipetováno do jamek mikrotitrační destičky.
15. 150 µl vzorku bylo napipetováno v duplikátech do jamek mikrotitrační destičky.
16. Byla změřena absorbance při 532 nm spektrofotometrem Synergy HT.
17. Vyhodnocení probíhalo v programu Microsoft Excel.

Tab. 10: Roztoky pro kolorimetrické stanovení peroxidace lipidů

Thiobarbiturová kyselina 0,67% (w/v)	67 mg rozpuštěno v 1 ml DMSO doplněno H ₂ O do 10 ml
Trichloroctová kyselina 10% (w/v)	1 g TCA rozpuštěn v 10 ml H ₂ O
1,1,3,3-tetrametoxypentan 500 µM	4,12 g rozpuštěno v 1 ml etanolu doplněno H ₂ O do 50 ml
Lyzační pufr (pH 6,8)	0,1 M Tris-HCl (6,05 g rozpuštěno v 500 ml H ₂ O) 1 % SDS – 5 g SDS rozpuštěno v 500 ml 0,1 M Tris-HCl

Kolorimetrické stanovení karbonylace proteinů

Principem kolorimetrického stanovení karbonylace proteinů je reakce 2,4-dinitrofenylhydrazinu s karbonylovými skupinami proteinů. Reakcí vzniká 2,4-dinitrofenylhydrazon. Množství 2,4-dinitrofenylhydrazonu odpovídá přímo úměrně množství karbonylovaných proteinů. Hodnoty absorbance při 370 nm odpovídají přímo úměrně množství 2,4-dinitrofenylhydrazonu.

Postup práce:

Buněčné pelety získané postupem popsáním v kapitole „Aplikace ligandů, CoCl₂ a zpracování buněk“ byly zpracovány takto:

1. Bylo připraveno potřebné množství lyzačního pufru s 2% obsahem směsi inhibitorů proteáz („Complete protease inhibitor cocktail“ – Sigma).
2. Do každé 1,5ml mikrozkušavky s peletami bylo napipetováno 300 µl lyzačního pufru.
3. Pelety byly postupně dvakrát sonikovány na ledu 20 s při výkonu 80 % a jednou 20 s při výkonu 60 %.
4. Lyzáty byly centrifugovány 15 minut při 10 000 g a 4 °C.
5. Supernatant byl uchován v mrazáku při teplotě -80 °C.

6. Následující den bylo 100 µl supernatantu vzorků napipetováno do mikrotitrační destičky a byla změřena absorbance při 260 nm a 280 nm. Poměr absorbancí 280/260 nm byl větší než 1, postup pokračoval v bodě 7. V opačném případě by bylo nutné provést čištění 1% roztokem streptomycinsulfátu.
7. 10 µl supernatantu bylo odebráno pro stanovení koncentrace proteinů.
8. Vzorky byly naředěny na stejnou koncentraci proteinů v nových 1,5ml mikrozkuvkách
9. K 300 µl supernatantu bylo přidáno 300 µl 10 mM roztoku 2,4,-dinitrofenylhydrazinu (DNPH)
10. Byl vytvořen blank smícháním 300 µl jednoho vzorku s 300 µl 2,5 M HCl.
11. Inkubace blanku a supernatantu s DNPH probíhala ve tmě 1 h. Protřepání vzorku probíhalo každých 10 minut.
12. Bylo přidáno 600 µl 40% TCA a vzorky byly inkubovány 10 minut na ledu.
13. Vzorky byly centrifugovány 15 minut při 16 000 g a 4 °C.
14. Pelety byly třikrát přečištěny:
 - a. Přidáním 1 ml roztoku etanol/etyl-acetát (v/v).
 - b. Inkubací 10 minut.
 - c. Centrifugací 5 minut při 16 000 g a 4 °C.
15. Pelety byly rozpuštěny v 1 ml roztoku 6 M guanidinu při 37 °C.
16. Nerozpuštěné zbytky vysrážených proteinů byly centrifugovány 5 minut při 16 000 g a 4 °C.
17. 220 µl supernatantu bylo napipetováno v triplicátech do mikrotitrační destičky.
18. Absorbance byla změřena spektrofotometrem Synergy HT při 370 nm.
19. Vyhodnocení probíhalo v programu Microsoft Excel.

Tab. 11: Roztoky pro kolorimetrické stanovení karbonylace proteinů

2,5 M HCl (100 ml)	20,53 ml 37% HCl pomalu přidáváno do 25 ml H ₂ O doplněno H ₂ O do 100 ml
40% TCA (100 ml)	40 g TCA doplněno H ₂ O do 100 ml
10 mM Fosfátový pufr (PBS), pH 7,4 (100 ml)	0,8 g NaCl 0,02 g KCl 0,144 g Na ₂ HPO ₄ 0,024 g KH ₂ PO ₄ doplněno H ₂ O do 100 ml
Etyl-acetát/etanol (v/v) (500 ml)	250 ml etyl-acetátu 250 ml etanolu
6 M guanidin v 10 mM PBS, pH 2,3 (50 ml)	28,66 g guanidinu pH upraveno trifluoroctovou kyselinou (TFA)

10 mM DNPH (10 ml)	0,0198 g rozpuštěno ve 2 ml 50% H ₂ SO ₄ doplněno 2,5 M HCl do 10 ml
Lyzační pufr (pH 6,8) (500 ml)	0,1 M Tris-HCl (6,05 g rozpuštěno v 500 ml H ₂ O) 1 % SDS – 5 g SDS rozpuštěno v 500 ml 0,1 M Tris-HCl

Mikroskopická pozorování

Pro mikroskopické pozorování byla využita fluorescenční sonda, dihydrofluorescein. Dihydrofluorescein se pod vlivem oxidujících agens v buňce oxiduje na fluorescein, přičemž dochází ke světelné emisi při 490 nm. Koncentrace ROS v buňce by měla přímo úměrně korelovat s intenzitou světelné emise. V této práci byl dihydrofluorescein využit pouze pro orientační porovnání vlivu CoCl₂ na PC12 buňky.

Statistické zpracování výsledků

Vyhodnocení naměřených dat probíhalo v programu Microsoft Excel. Výsledky byly vyjádřeny jako aritmetický průměr s procentuálním vyjádřením směrodatné odchylky mezi průměrovanými hodnotami. Směrodatná odchylka byla prepočítána na procentuální hodnotu z aritmetického průměru. Statistická významnost rozdílů byla hodnocena pomocí Studentova *t*-testu na hladině $p < 0,05$.

Výsledky

Karbonylace proteinů

Koncentrace proteinů v lyzátech po sonikaci buněčných pelet byla stanovena biochemickou analýzou pomocí kyseliny bicinchoninové. Vzorky byly naředěny na stejnou koncentraci proteinů $0,1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Tab. 12: Ředění vzorků pro analýzu karbonylace proteinů

	Proteiny ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	Vzorek (μl)	H ₂ O (μl)	Naředěný vzorek ($0,1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) (μl)
LPI	0,815	36,8	263,2	300,0
LPI + CID-16020046	1,085	27,7	272,3	300,0
LPI + CoCl₂	0,552	54,4	245,6	300,0
CoCl₂	0,594	50,5	249,5	300,0
Rimonabant	1,091	27,5	272,5	300,0
Rimonabant + CID-16020046	0,678	44,3	255,7	300,0
Rimonabant + CoCl₂	0,436	68,8	231,2	300,0
Rimonabant + CID-16020046 + CoCl₂	0,168	178,6	121,4	300,0
O-1602	1,17	25,6	274,4	300,0
O-1602 + CID-16020046	0,662	45,3	254,7	300,0
O-1602 + CoCl₂	0,678	44,3	255,7	300,0
O-1602 + CID-16020046 + CoCl₂	0,31	96,8	203,2	300,0
2-AG	1,175	25,5	274,5	300,0
2-AG + CID-16020046	0,884	33,9	266,1	300,0
2-AG + CoCl₂	0,273	109,9	190,1	300,0
2-AG + CID-16020046 + CoCl₂	0,176	170,5	129,5	300,0
CID-16020046	1,345	22,3	277,7	300,0
CID-16020046 + CoCl₂	0,627	47,9	252,1	300,0
Kontrola	0,657	45,7	254,3	300,0
CoCl₂	0,315	95,2	204,8	300,0

Koncentrace karbonylovaných proteinů byla vypočtena podle vzorce

$C = \frac{A}{\epsilon \cdot l}$, kde A značí průměrnou hodnotu absorbance, ϵ je absorpční molární koeficient a l je

výška jamky titrační destičky. Koncentrace karbonylovaných proteinů byla vztažena na mg proteinu. V naředěném vzorku bylo 30 μg proteinu.

$$\epsilon = 0,022 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

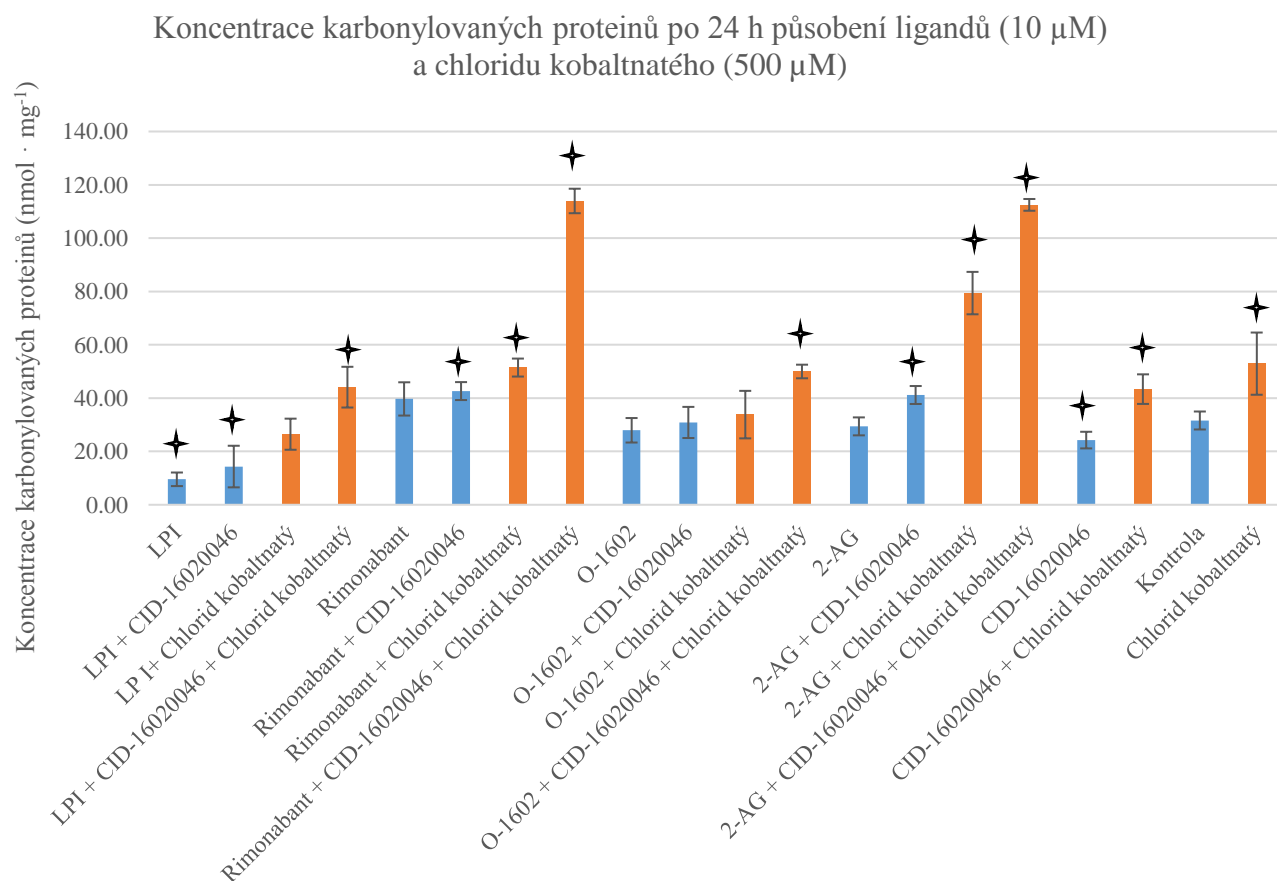
$$l = 0,687 \text{ cm}$$

Směrodatná odchylka určuje míru rozptýlení hodnot absorbancí od průměru. Byla vypočtena

podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}}$, kde x je střední hodnota výběru průměr a n je velikost hodnoty.

Tab. 13: Absorbance a koncentrace karbonylovaných proteinů

	Průměr absorbancí	Koncentrace karbonylovaných proteinů (nmol · mg ⁻¹)	Směrodatná odchylka koncentrací
LPI	0,0043	9,56	2,667907
LPI + CID-16020046	0,0065	14,34	7,721538
LP I+ CoCl₂	0,0120	26,47	5,735167
CoCl₂	0,0200	44,11	7,71925
Rimonabant	0,0180	39,70	6,175556
Rimonabant + CID-16020046	0,0193	42,64	3,31399
Rimonabant + CoCl₂	0,0233	51,46	3,312876
Rimonabant + CID-16020046 + CoCl₂	0,0517	113,95	4,62853
O-1602	0,0127	27,94	4,62
O-1602 + CID-16020046	0,0140	30,88	5,734857
O-1602 + CoCl₂	0,0153	33,82	8,84183
O-1602 + CID-16020046 + CoCl₂	0,0227	49,99	2,642643
2-AG	0,0133	29,41	3,316917
2-AG + CID-16020046	0,0187	41,17	3,302406
2-AG + CoCl₂	0,0360	79,40	7,94
2-AG + CID-16020046 + CoCl₂	0,0510	112,48	2,20549
CID-16020046	0,0110	24,26	3,087636
CID-16020046 + CoCl₂	0,0197	43,37	5,503807
Kontrola	0,0143	31,61	3,315734
CoCl₂	0,0240	52,93	11,68871

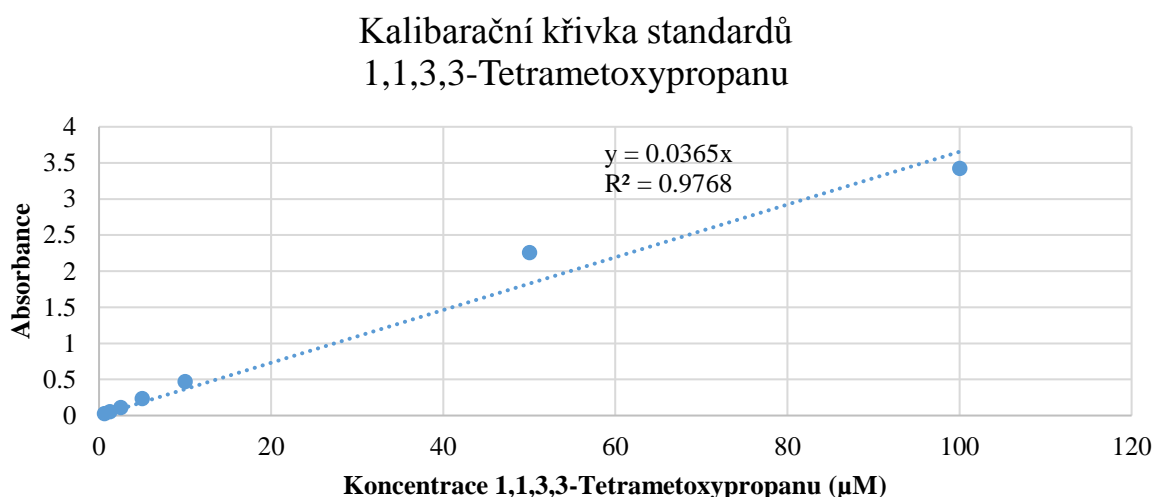


Graf 1: Koncentrace karboxylovaných proteinů po 24 h působení ligandů (10 μM) a CoCl_2 (500 μM)

Kolorimetrické stanovení karboxylovaných proteinů ukázalo, že přítomnost chloridu kobaltnatého zvyšuje koncentraci karboxylovaných proteinů. Nejvyšších koncentrací dosahovaly vzorky v kombinacích 10 μM Rimonabantu, 10 μM CID-16020046 a 500 μM CoCl_2 ; 10 μM 2-AG a 500 μM CoCl_2 ; 10 μM 2-AG, 10 μM CID-16020046 a 500 μM CoCl_2 , zatímco přítomnost LPI karboxylaci proteinů snižovala. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je znázorněna křížkem. Z grafu vyplývá, že kombinace Rimonabantu a 2-AG s CID-16020046 a CoCl_2 výrazně zvyšuje karboxylaci proteinů (Graf 1).

Lipoperoxidace

Koncentrace peroxidovaných lipidů byla vypočtena podle rovnice kalibrační křivky standardů 1,1,3,3-tetrametoxypromanu. Koncentrace byla vztažena na mg proteinu vzorku. Z absorbancí koncentrační řady standardů byla sestavena kalibrační křivka.



Graf 2: Kalibrační křivka standardů 1,1,3,3-Tetrametoxypromanu

Koncentrace peroxidovaných lipidů C byla vypočtena podle vzorce: $C = \frac{A}{0,0365}$, kde A je

hodnota průměrné absorbance vzorku po odečtení absorbance blanku a hodnota 0,0365 je poměrem mezi y a x z rovnice kalibrační křivky. Podíl mezi vypočtenou koncentrací peroxidovaných lipidů a koncentrací proteinů změřenou pomocí BCA analýzy udává koncentraci peroxidovaných lipidů vztaženou na mg proteinu. Směrodatná odchylka určuje

míru rozptýlení hodnot absorbancí od průměru. Byla vypočtena podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}}$,

kde \bar{x} je střední hodnota výběru průměr a n je velikost hodnoty.

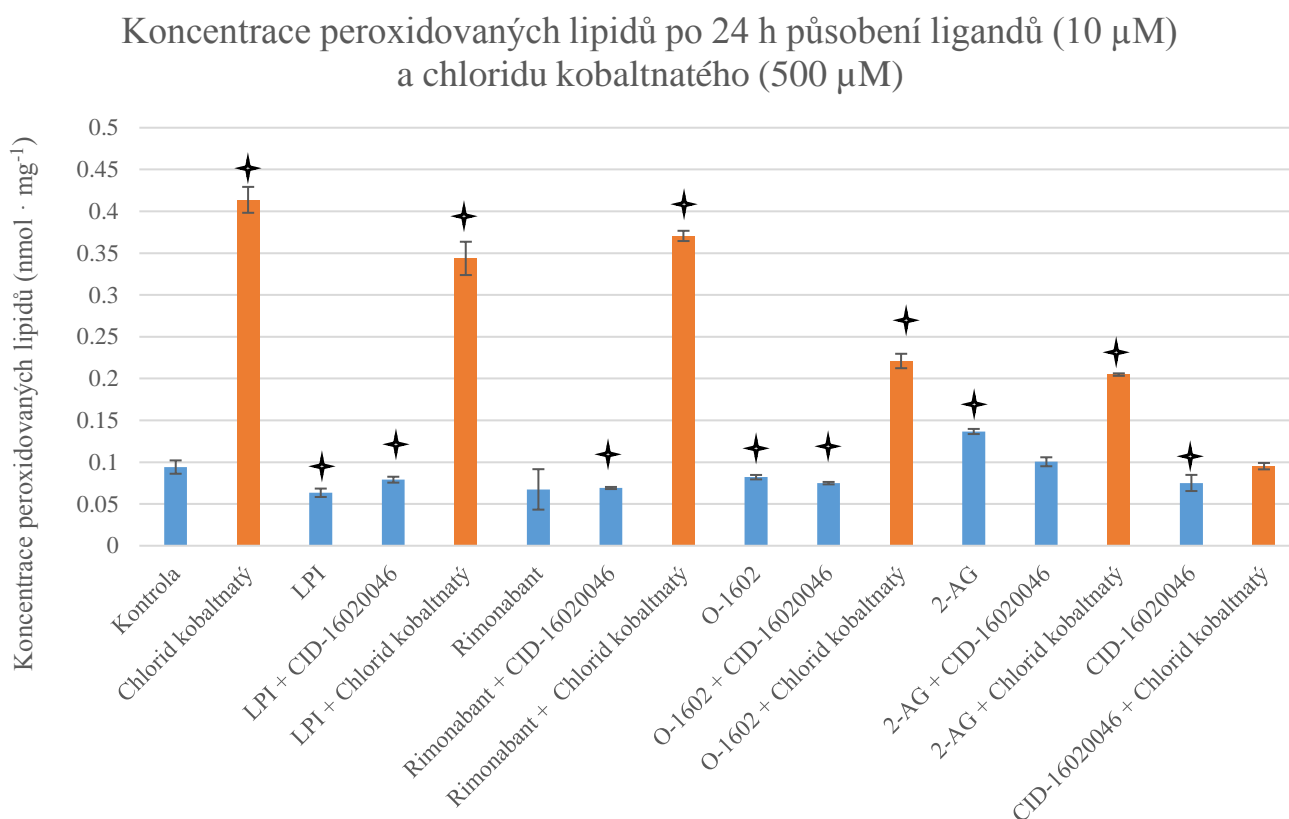
Tab. 14: Koncentrace proteinů vzorků a průměrné hodnoty absorbancí

	Koncentrace proteinů u vzorků ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Průměr korigovaných absorbancí (po odečtení absorbance blanku)
Kontrola	14,558	0,05
CoCl₂	9,999	0,151
LPI	19,242	0,0445
LPI + CID-16020046	16,467	0,0475
LPI + CoCl₂	9,725	0,122
Rimonabant	13,616	0,0335
Rimonabant + CID-16020046	15,272	0,0385
Rimonabant + CoCl₂	9,5	0,1285
O-1602	14,693	0,044
O-1602 + CID-16020046	13,352	0,0365
O-1602 + CoCl₂	11,22	0,0905
2-AG	12,629	0,063
2-AG + CID-16020046	14,453	0,053
2-AG + CoCl₂	13,049	0,0975
CID-16020046	18,057	0,0495
CID-16020046 + CoCl₂	15,11	0,0525

Tab. 15: Koncentrace peroxidovaných lipidů vztažená na 100 μl vzorku a na 1 mg proteinu

	Koncentrace peroxidovaných lipidů ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)
Kontrola	0,05
CoCl₂	0,151
LPI	0,0445
LPI + CID-16020046	0,0475
LPI + CoCl₂	0,122
Rimonabant	0,0335
Rimonabant + CID-16020046	0,0385
Rimonabant + CoCl₂	0,1285
O-1602	0,044
O-1602 + CID-16020046	0,0365
O-1602 + CoCl₂	0,0905
2-AG	0,063
2-AG + CID-16020046	0,053
2-AG + CoCl₂	0,0975
CID-16020046	0,0495
CID-16020046 + CoCl₂	0,0525

Hodnoty absorbance u kolorimetrického stanovení peroxidace lipidů ukázaly, že v přítomnosti chloridu kobaltnatého je po 24 h zvýšené množství peroxidovaných lipidů. Ke snížení koncentrace došlo při aplikaci O-1602, 2-AG a především při aplikaci inverzního agonisty GPR55 CID-16020046. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem (Graf 3).



Graf 3: Grafické znázornění koncentrace peroxidovaných lipidů po 24 h působení ligandů (10 μ M) a CoCl_2 (500 μ M).
Oranžové sloupce značí vzorky s CoCl_2 .

Signalizace

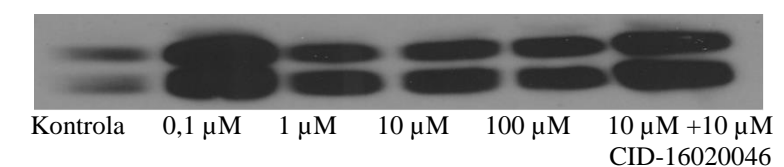
Vyhodnocení imunoblotingu proběhlo v programu ImageJ. Membrána obarvená roztokem Ponceau byla naskenována. Obraz byl uložen ve formátu tif a následně převeden do černobílé podoby. Kontrast a jas byl upraven podle potřeby. Digitalizací signálu bylo vypočteno procentuální zastoupení množství proteinu v jedné vertikální linii nanášky ze všech linií nanášek. Například pokud bylo na membráně naneseno pět vzorků o stejné koncentraci proteinů v pěti liniích, tak by v ideálním případě mělo být zastoupení jedné linie 20 %.

Analýza v ImageJ probíhala v triplicátech. Stejným způsobem proběhla analýza detekovaných proteinů na fotografickém filmu. Podíl mezi číselnou hodnotou optické denzity detekovaného proteinu z filmu a hodnotou proteinu z membrány vyjadřoval míru exprese daného proteinu.

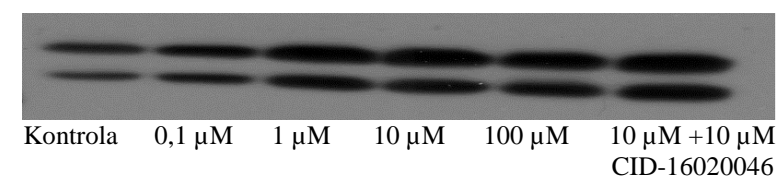
Fosforylace ERK 1/2

Fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení LPI

Aplikace LPI způsobila nejvyšší míru fosforylace v koncentraci 0,1 μM . Kombinace 10 μM LPI a 10 μM CID-16020046 fosforylaci nesnižovala. Inverzní agonista CID-16020046 může sám o sobě ve vyšších koncentracích skrze neznámý receptor fosforylovat ERK 1/2. Působení ligandů trvalo 10 minut. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem a hvězdičkou (Graf 4 a obr. 3).

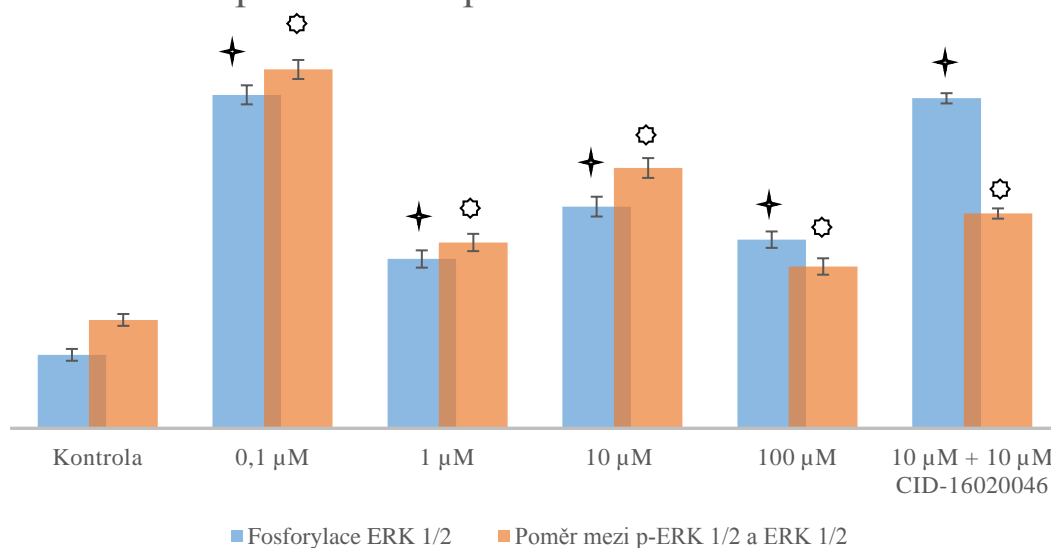


Obr. 3: Fosforylace ERK 1/2



Obr. 4: Nefosforylovaná forma ERK 1/2

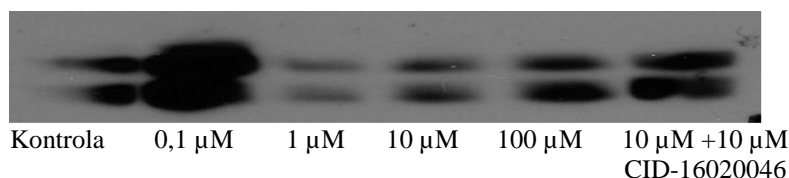
Fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení LPI a poměr mezi p-ERK 1/2 a ERK 1/2



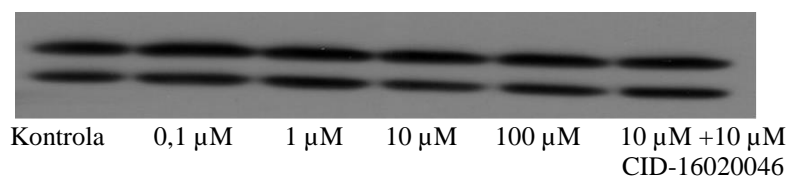
Graf 4: Změna fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení LPI a poměr mezi p-ERK 1/2 a ERK 1/2

Fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení Rimonabantu

Aplikace Rimonabantu vykazovala podobné výsledky jako s LPI. Nejvyšší míra fosforylace byla detekována také při aplikaci 0,1 μM Rimonabantu. Kombinace 10 μM Rimonabantu a 10 μM CID-16020046 indukovala fosforylaci intenzivněji než samotný rimonabant v koncentraci 10 μM . Působení ligandů trvalo 10 minut. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem a hvězdičkou (Graf 6 a obr. 5).

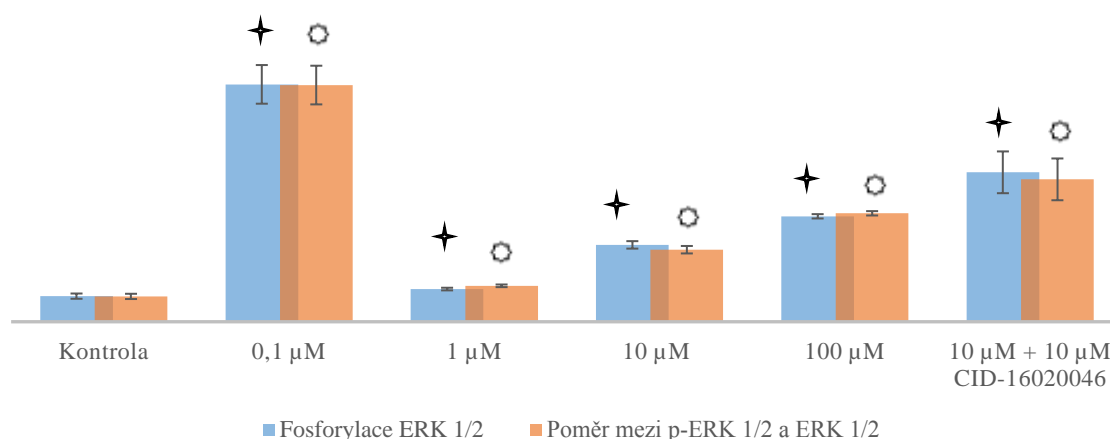


Obr. 5: Změna fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení Rimonabantu



Obr. 6: Nefosforylovaná forma ERK 1/2

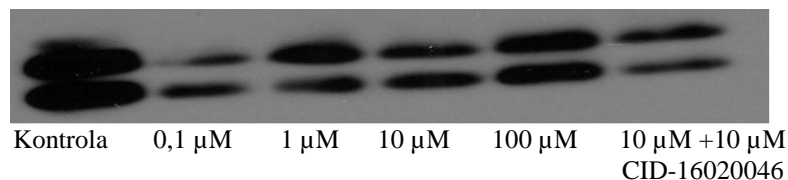
Fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení Rimonabantu a poměr mezi p-ERK 1/2 a ERK 1/2



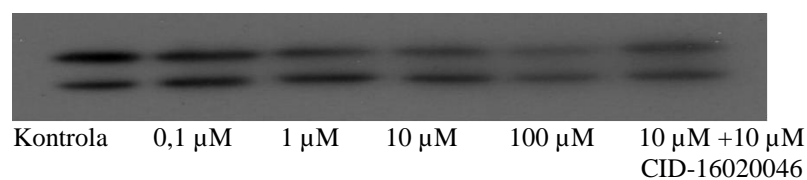
Graf 5: Změna fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení Rimonabantu a poměr mezi p-ERK 1/2 a ERK 1/2

Fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení O-1602

Selektivní agonista O-1602 vykazoval nejvyšší poměr mezi p-ERK 1/2 a ERK 1/2 až ve vysoké koncentraci 100 μM . Úroveň fosforylace v přítomnosti 10 μM O-1602 byla téměř shodná s úrovní fosforylace při kombinaci 10 μM O-1602 a 10 μM CID-16020046. Nejvyšší úroveň fosforylace byla u kontrolního vzorku. Působení ligandů trvalo 10 minut. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem a hvězdičkou (Graf 7 a obr. 6).

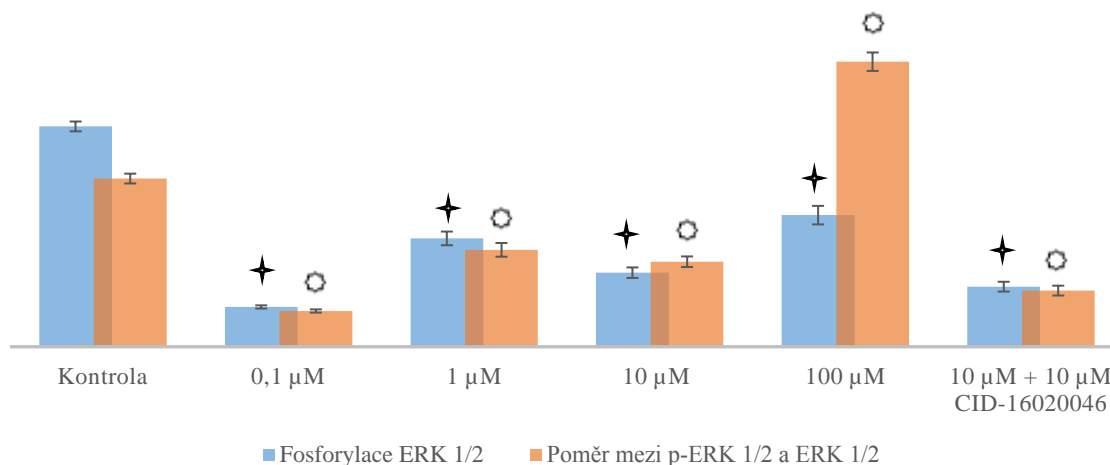


Obr. 6: Změna fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení O-1602



Obr. 7: Nefosforylovaná forma ERK 1/2

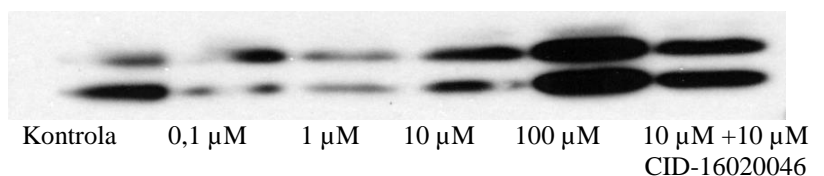
Fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení O-1602 a poměr mezi p-ERK 1/2 a ERK 1/2



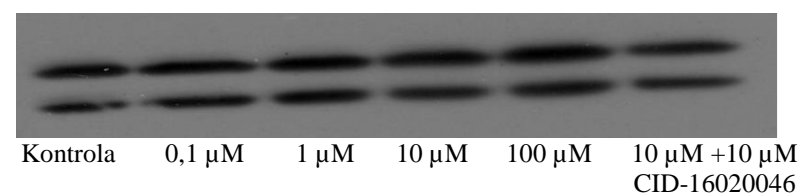
Graf 6: Změna fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení O-1602 a poměr mezi p-ERK 1/2 a ERK 1/2

Fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení 2-AG

Vyšší intenzitu fosforylace než u klidového stavu kontrolního vzorku vykazoval 2-AG až při koncentraci 100 μM . Kombinace 10 μM 2-AG a 10 μM CID-16020046 ukazuje na synergii obou ligandů při fosforylaci ERK 1/2. Působení ligandů trvalo 10 minut. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem a hvězdičkou (Graf č. 8 a obr. č. 8).

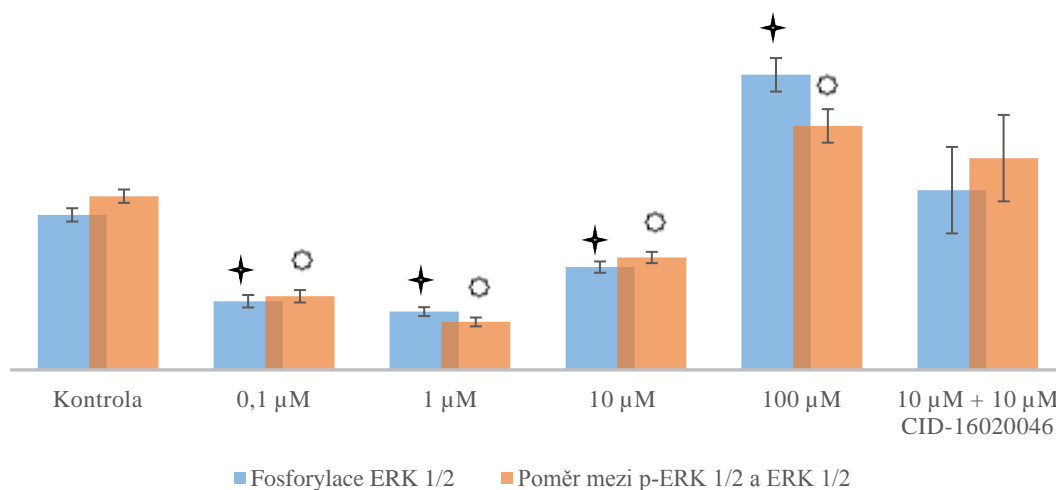


Obr. 8: Změna fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení 2-AG



Obr. 9: Nefosforylovaná forma ERK 1/2

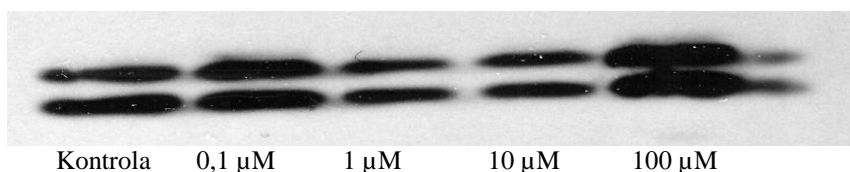
Fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení 2-AG a poměr mezi p-ERK 1/2 a ERK 1/2



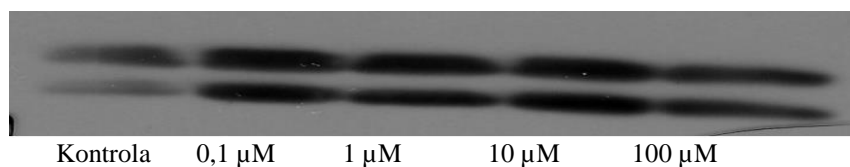
Graf 7: Změna fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení 2-AG a poměr mezi p-ERK 1/2 a ERK 1/2

Fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení CID-16020046

Samotný CID-16020046 do koncentrace 10 μM úroveň fosforylace snižoval. Ve vysoké koncentraci 100 μM fosforylaci zvyšoval. Lze to přisuzovat neselektivní aktivaci neznámého receptoru. Tyto vysoké koncentrace mohou způsobovat současnou inhibici GPR55 a aktivaci neznámého receptoru. Působení ligandů trvalo 10 minut. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem a hvězdičkou (Graf 9 a obr. 10).

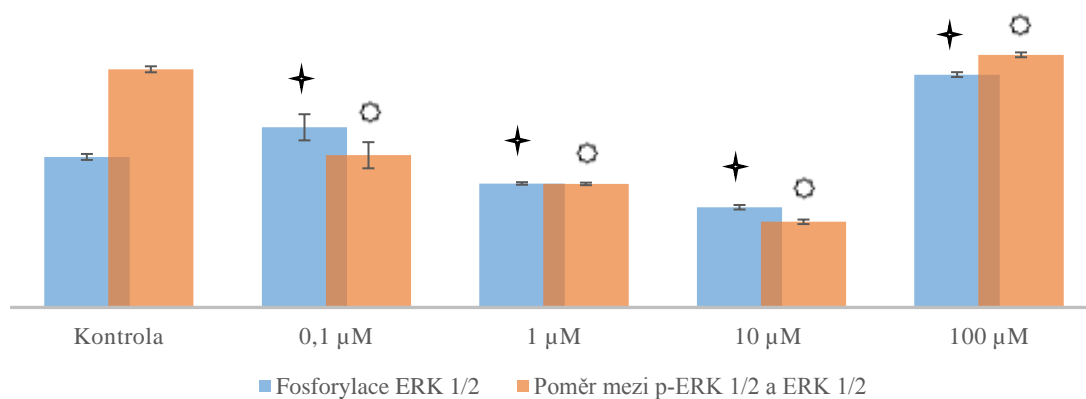


Obr. 10: Změna fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení CID-16020046



Obr. 11: Nefosforylovaná forma ERK 1/2

Fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení CID-16020046 a poměr mezi p-ERK 1/2 a ERK 1/2

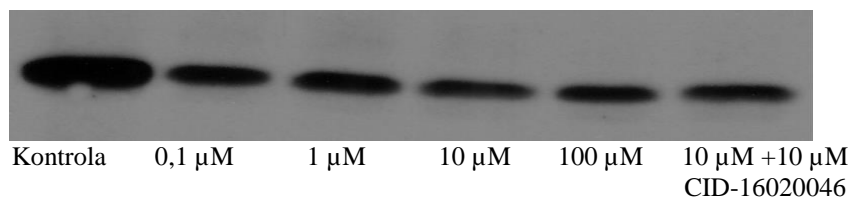


Graf 8: Změna fosforylace ERK 1/2 po 10 min. působení CID-16020046 a poměr mezi p-ERK 1/2 a ERK 1/2

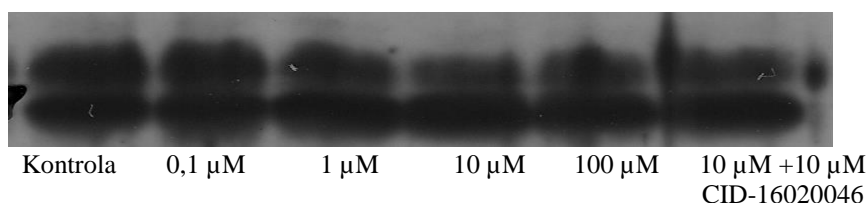
Fosforylace Akt (PKB)

Fosforylace Akt po 10 min. působení LPI

Nepodařilo se detekovat fosforylaci proteinkinázy B (Akt) v závislosti na řádově se zvyšující koncentraci LPI. Nejvyšší úroveň fosforylace byla detekována v kontrolním vzorku. Působení ligandů trvalo 10 minut. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem a hvězdičkou (Graf 10 a obr. 12).

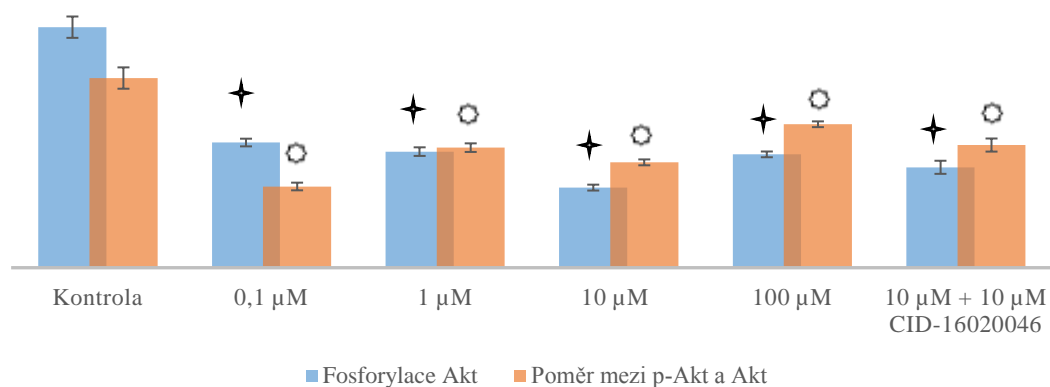


Obr. 12: Fosforylace Akt



Obr. 13: Nefosforylovaná forma Akt ½

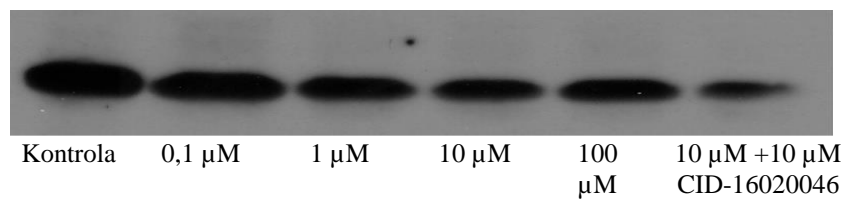
Fosforylace Akt (PKB) po 10 min. působení LPI a poměr mezi p-Akt a Akt



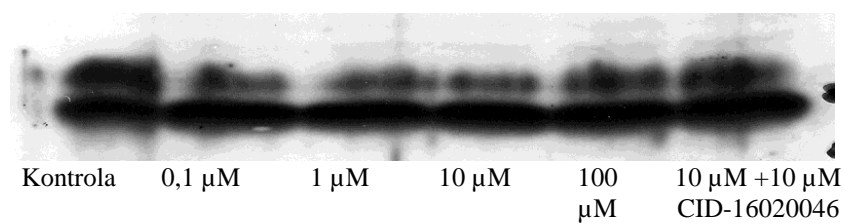
Graf 9: Změna fosforylace Akt po 10 min. působení LPI a poměr mezi p-Akt a Akt

Fosforylace Akt po 10 min. působení Rimonabantu

Nepodařilo se detekovat fosforylaci proteinkinázy B (Akt) v závislosti na řádově se zvyšující koncentraci Rimonabantu. Nejvyšší úroveň fosforylace byla detekována v kontrolním vzorku. Působení ligandů trvalo 10 minut. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem a hvězdičkou (Graf 11 a obr. 14).

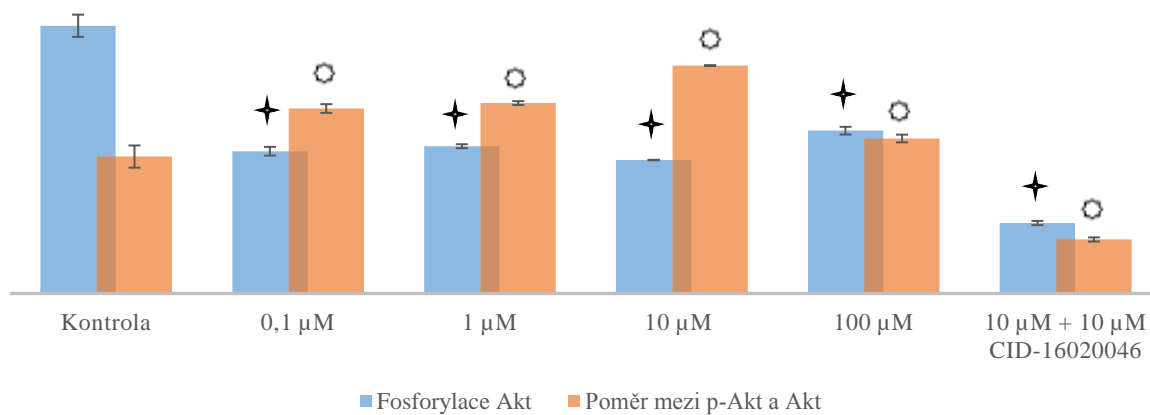


Obr. 14: Fosforylace Akt



Obr. 15: Nefosforylovaná forma Akt 1/2

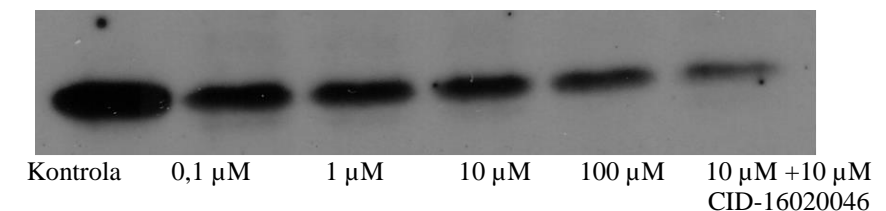
Fosforylace Akt (PKB) po 10 min. působení Rimonabantu a poměr mezi p-Akt a Akt



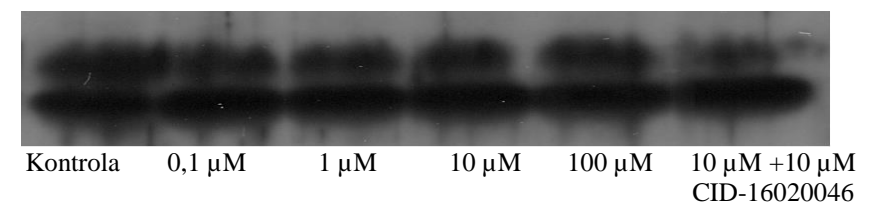
Graf 10: Fosforylace Akt po 10 min. působení Rimonabantu a poměr mezi p-Akt a Akt

Fosforylace Akt po 10 min. působení O-1602

Nepodařilo se detekovat fosforylaci proteinkinázy B (Akt) v závislosti na řádově se zvyšující koncentraci O-1602. Nejvyšší úroveň fosforylace byla detekována v kontrolním vzorku. Působení ligandů trvalo 10 minut. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem a hvězdičkou (Graf 12 a obr. 15).

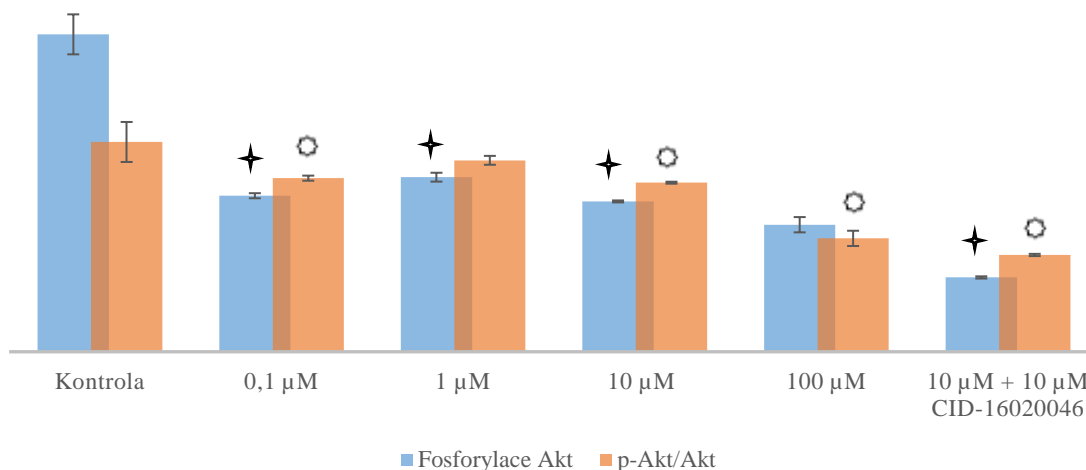


Obr. 15: Fosforylace Akt



Obr. 16: Nefosforylovaná forma Akt 1/2

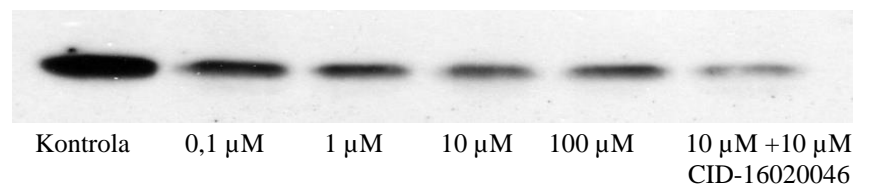
Fosforylace Akt po 10 min. působení O-1602 a poměr mezi p-Akt a Akt



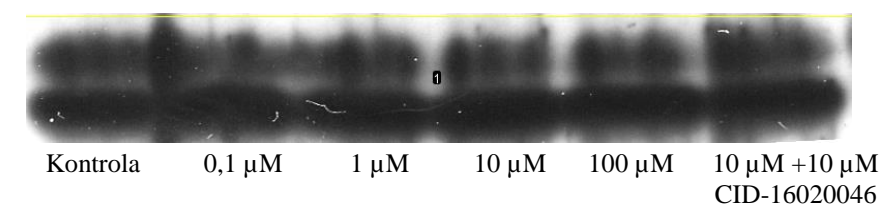
Graf 11: Fosforylace Akt po 10 min. působení O-1602 a poměr mezi p-Akt a Akt

Fosforylace Akt po 10 min. působení 2-AG

Nepodařilo se detekovat fosforylaci proteinkinázy B (Akt) v závislosti na řádově se zvyšující koncentraci 2-AG. Doba fosforylace byla 10 minut. Nejvyšší úroveň fosforylace byla detekována v kontrolním vzorku. Působení ligandů trvalo 10 minut. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem a hvězdičkou (Graf 13 a obr. 17).

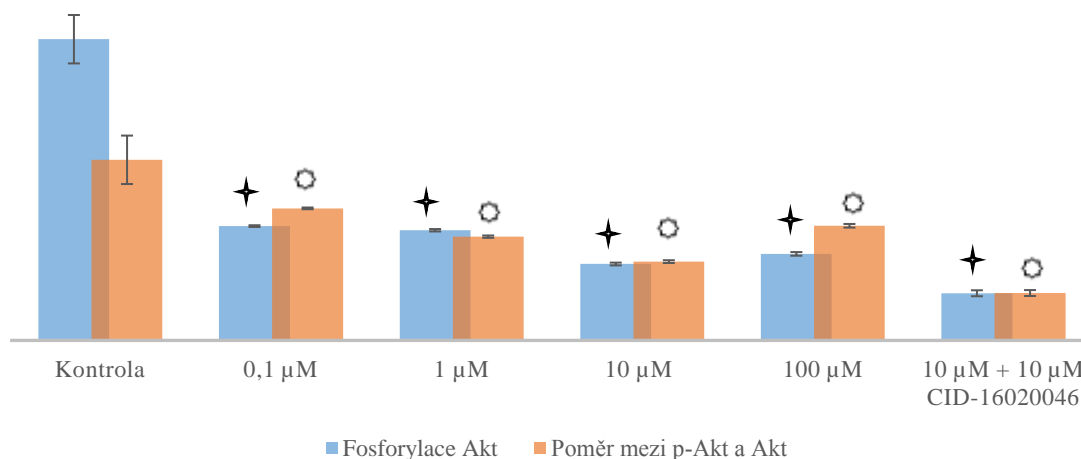


Obr. 17: Fosforylace Akt



Obr. 18: Nefosforylovaná forma Akt ½

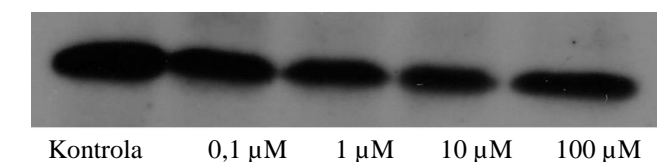
Fosforylace Akt (PKB) po 10 min. působení 2-AG a poměr mezi p-Akt a Akt



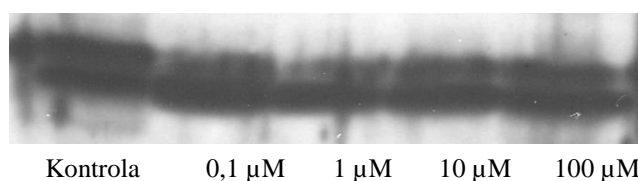
Graf 12: Fosforylace Akt po 10 min. působení 2-AG a poměr mezi p-Akt a Akt

Fosforylace Akt po 10 min. působení CID-16020046

Nepodařilo se detekovat fosforylaci proteinkinázy B (Akt) v závislosti na řádově se zvyšující koncentraci CID-16020046. Nejvyšší úroveň fosforylace byla detekována v kontrolním vzorku. Působení ligandů trvalo 10 minut. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem a hvězdičkou (Graf č. 14 a obr. č. 19).

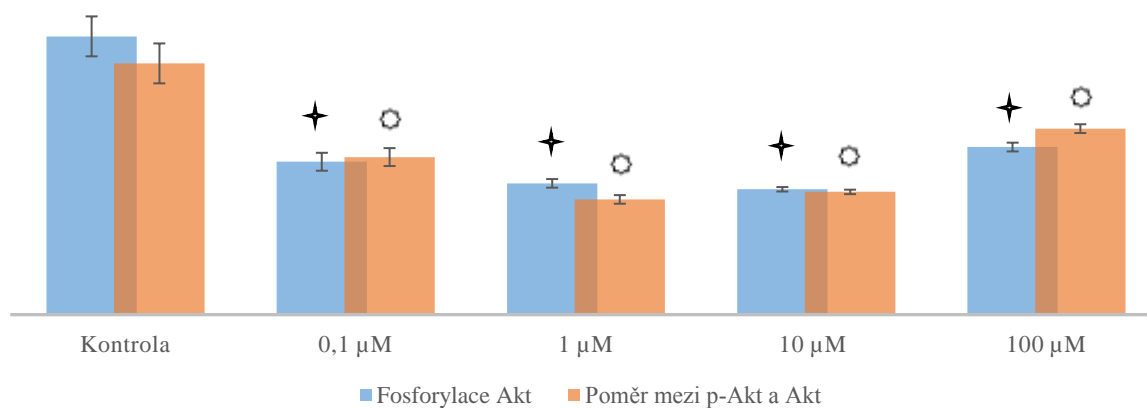


Obr. 19: Fosforylace Akt



Obr. 20: Nefosforylovaná forma Akt 1/2

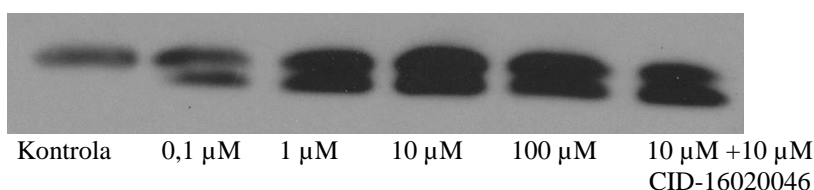
Fosforylace Akt po 10 min. působení CID-16020046 a poměr mezi p-Akt a Akt



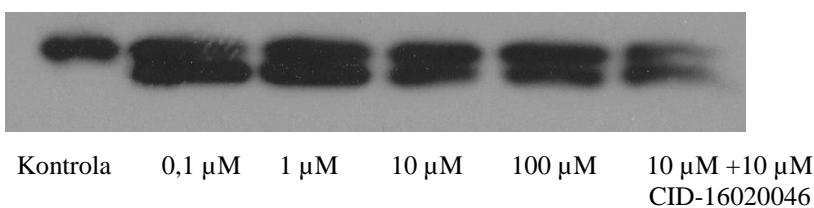
Graf 13: Fosforylace Akt po 10 min. působení CID-16020046 a poměr mezi p-Akt a Akt

Aktivace RhoA

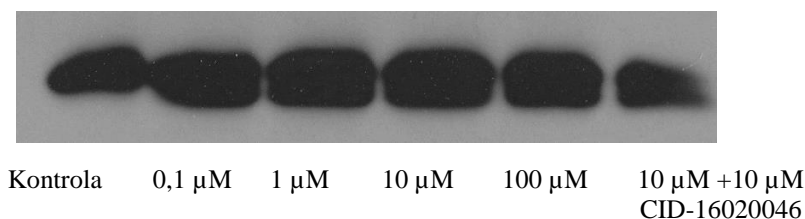
Aktivace RhoA probíhala v závislosti na zvyšující se koncentraci u všech ligandů kromě 2-AG. Aktivace samotným CID-16020046 nebyla měřena. Aplikace 10 μM CID-16020046 aktivaci RhoA snižovala. U výřezu z fotografického filmu lze u LPI a Rimonabantu pozorovat dva pruhy, které značí aktivovaný RhoA s navázaným GTP, jeden pruh označuje kontrolní vzorek bez navázaného GTP. U vzorků s O-1602 jsou také dva pruhy nad sebou, příslušný film byl však příliš dlouho exponován. Rozdílná situace je v případě 2-AG, kdy dva pruhy nelze pozorovat ani při vysoké koncentraci 100 μM . Působení ligandů trvalo 10 minut. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem (Graf 14 a obr. 21-24).



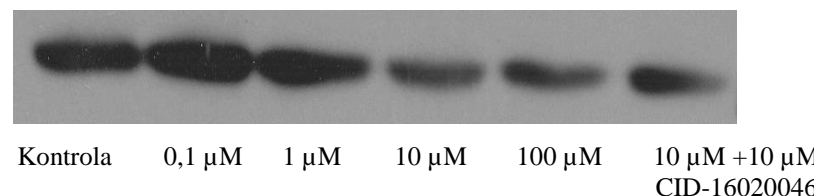
Obr. 21: Aktivace RhoA po 10 min. působení LPI



Obr. 22: Aktivace RhoA po 10 min. působení Rimonabantu

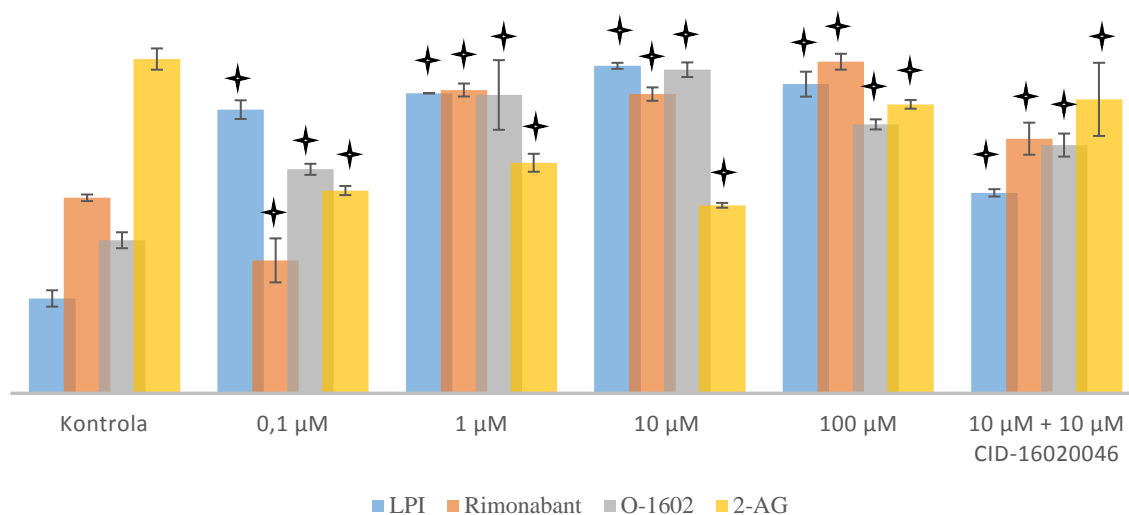


Obr. 23: Aktivace RhoA po 10 min. působení O-1602



Obr. 24: Aktivace RhoA po 10 min. působení 2-AG

Aktivace RhoA po 10 min. působení ligandů

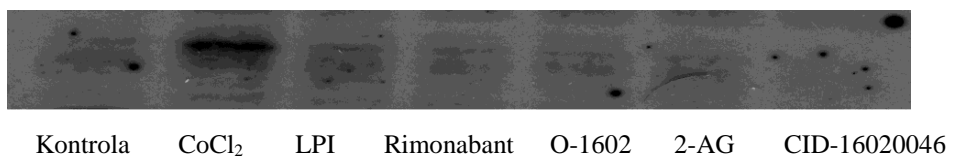


Graf 14: Fosforylace Akt po 10 min. působení CID-16020046 a poměr mezi p-Akt a Akt

Expresse Bax a Bcl-xL

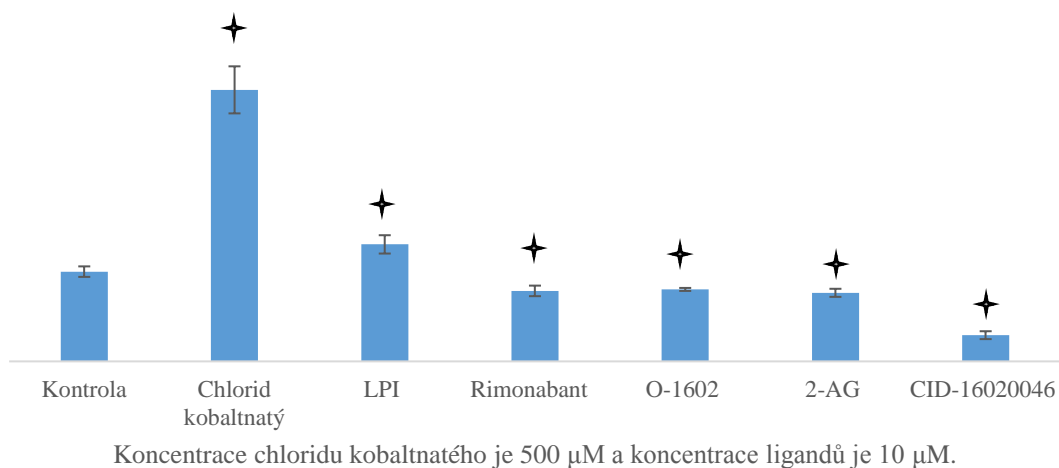
Změna exprese BAX po 24 h působení ligandů (10 μ M) nebo CoCl_2

Nejvyšší míru exprese proapoptického proteinu BAX lze pozorovat po 24 hodinách působení 500 μ M CoCl_2 . Samotné působení 10 μ M CID-16020046 expresi BAX snižovalo. Působení ligandů trvalo 24 h. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem (Graf 15 a obr. 25).



Obr. 25: Změna exprese BAX po 24 h působení ligandů (10 μ M) nebo CoCl_2 (500 μ M)

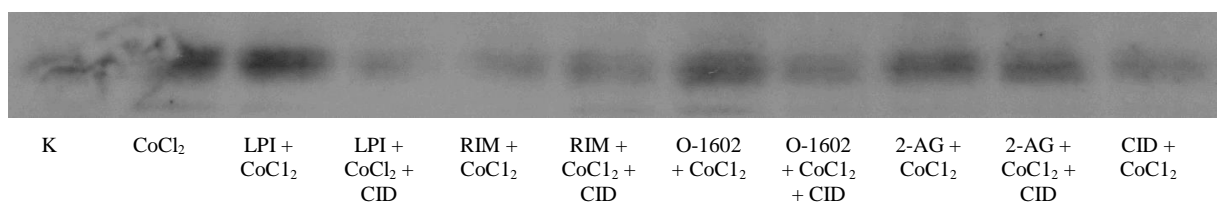
Změna exprese BAX po 24 h působení ligandů (10 μ M) nebo CoCl_2 (500 μ M)



Graf 15: Změna exprese BAX po 24 h působení ligandů (10 μ M) nebo CoCl_2 (500 μ M)

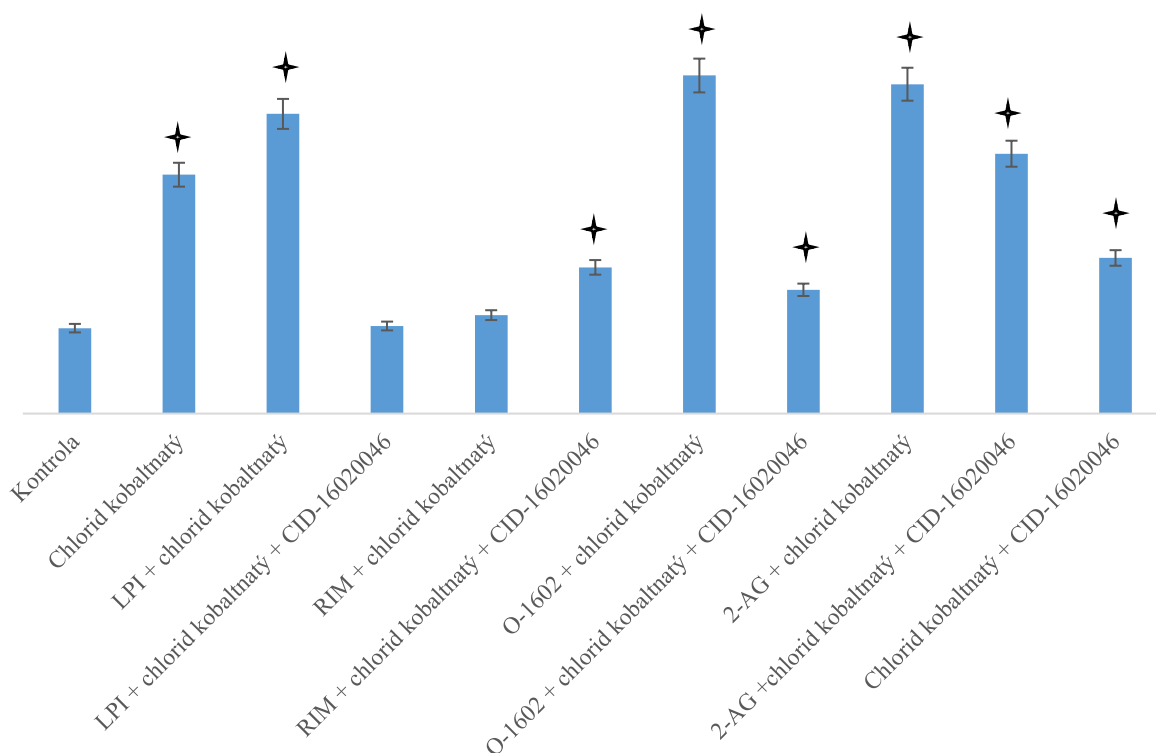
Změna exprese Bax po 24 h působení CoCl_2 (500 μM) a ligandů (10 μM)

Graf znázorňuje změnu exprese proteinu Bax po 24 h působení CoCl_2 a ligandů. Kombinace Rimonabantu, LPI, O-1602 s CID-16020046 v 10 μM koncentraci a CoCl_2 v 500 μM koncentraci výrazně snižovala expresi BAX až na úroveň kontrolního vzorku. Působení ligandů a CoCl_2 trvalo 10 minut. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem (Graf 16 a obr. 26).



Obr. 26: Expresa BAX po 24 h působení CoCl_2 (500 μM) a ligandů (10 μM)

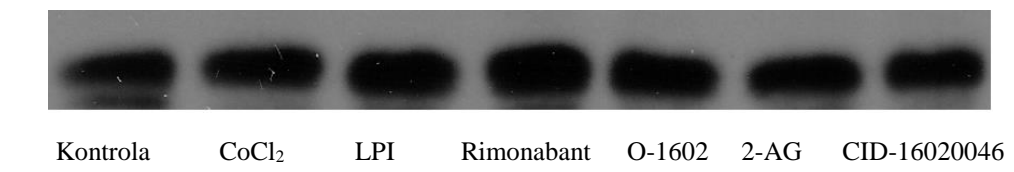
Změna exprese Bax po 24 h působení CoCl_2 (500 μM) a ligandů (10 μM)



Graf. 16: Expresa BAX po 24 h působení CoCl_2 (500 μM) a ligandů (10 μM)

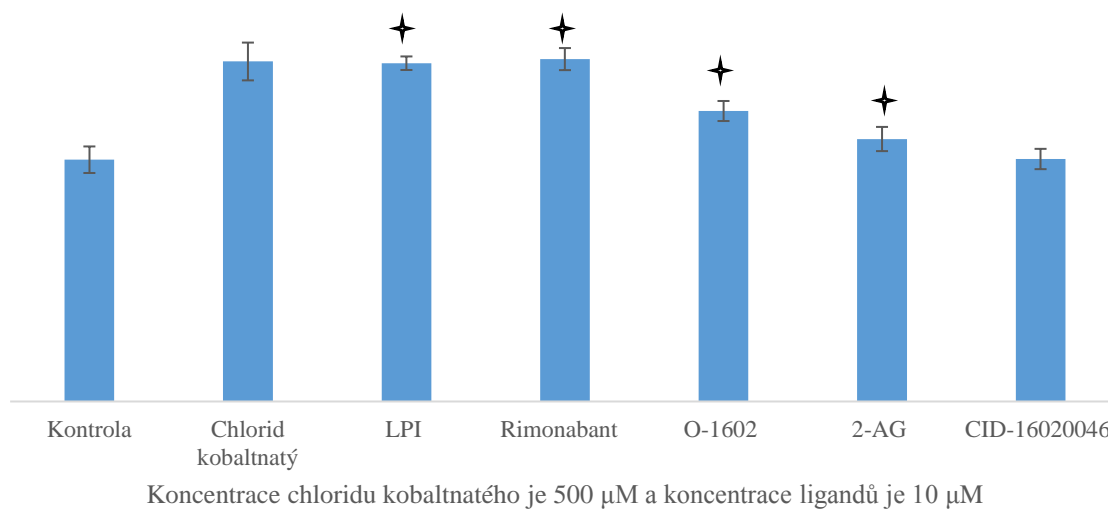
Změna exprese Bcl-xL po 24 působení ligandů (10 μ M) nebo CoCl₂ (500 μ M)

Míra exprese antiapoptotického proteinu Bcl-xL se výrazněji nemění při působení samotných ligandů ani při kombinacích ligandů s CoCl₂. Působení ligandů a CoCl₂ trvalo 24 h. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem (Graf 17 a obr. 27).



Obr. 27: Expresa Bcl-xL po 24 h působení ligandů nebo chloridu kobaltnatého

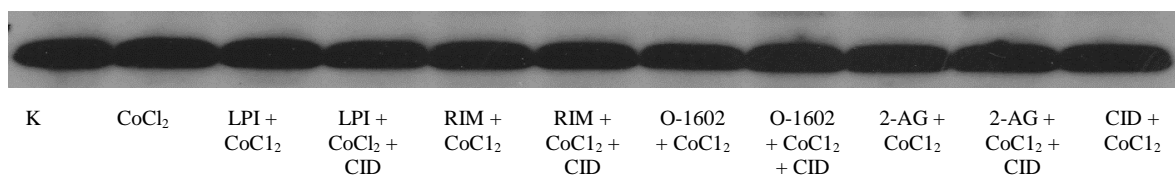
Změna exprese Bcl-xL po 24 h působení ligandů (10 μ M) nebo chloridu kobaltnatého (500 μ M)



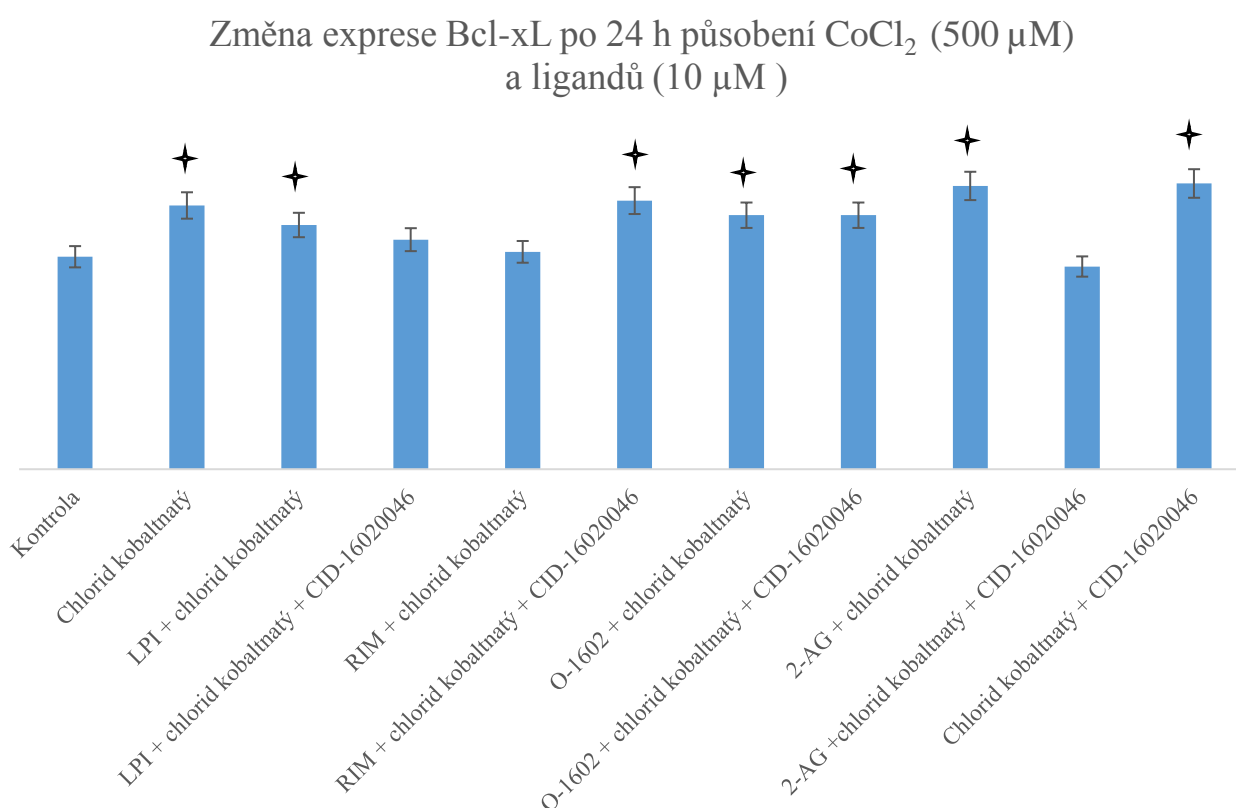
Graf 17: Změna exprese Bcl-xL po 24 h působení ligandů (10 μ M) nebo chloridu kobaltnatého (500 μ M).

Změna exprese Bcl-xL po 24 h působení ligandů (10 μ M) a CoCl₂

Graf 18 znázorňuje rozdíly v expresi antiapoptotického proteinu Bcl-xL po 24 h působení CoCl₂ (500 μ M) a ligandů. Změna exprese je oproti apoptotickému proteinu Bax méně výrazná. Působení ligandů a CoCl₂ trvalo 24 h. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem (Graf 18 a obr. 28).

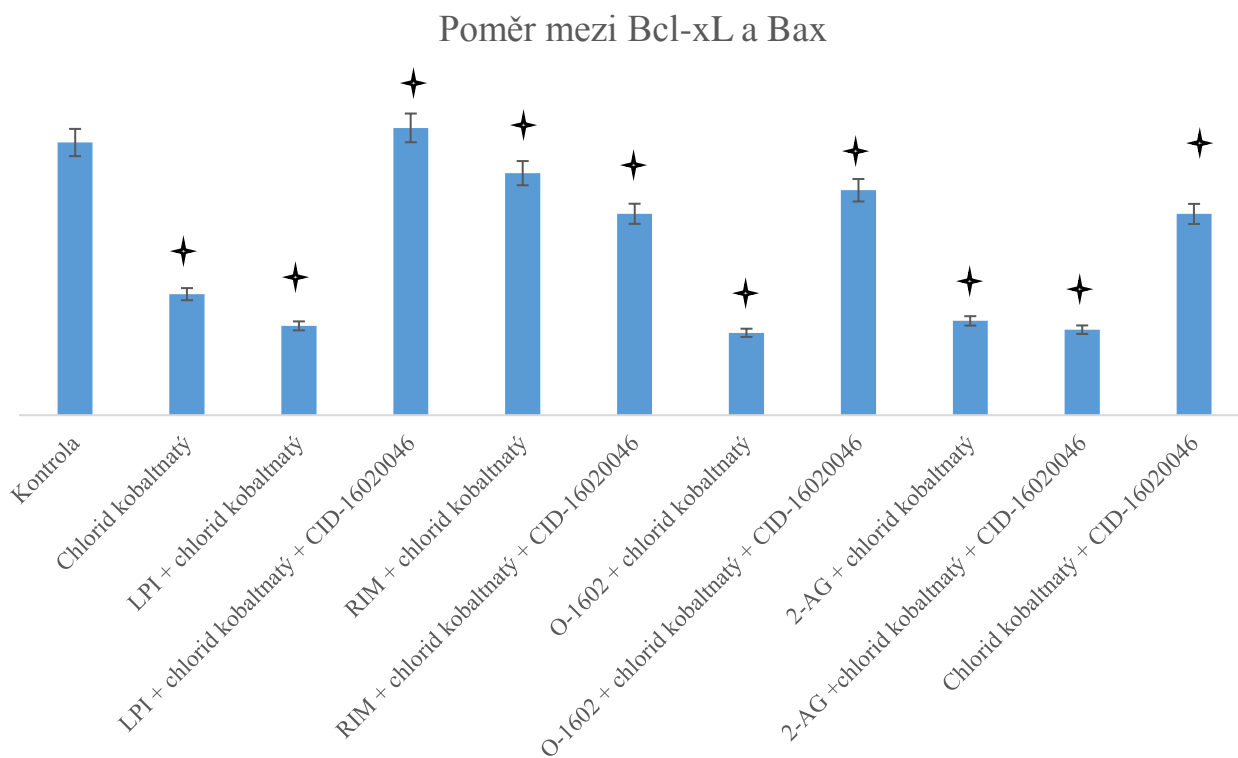


Obr. 28: Expresa Bcl-xL po 24 h působení CoCl₂ (500 μ M) a ligandů (10 μ M)



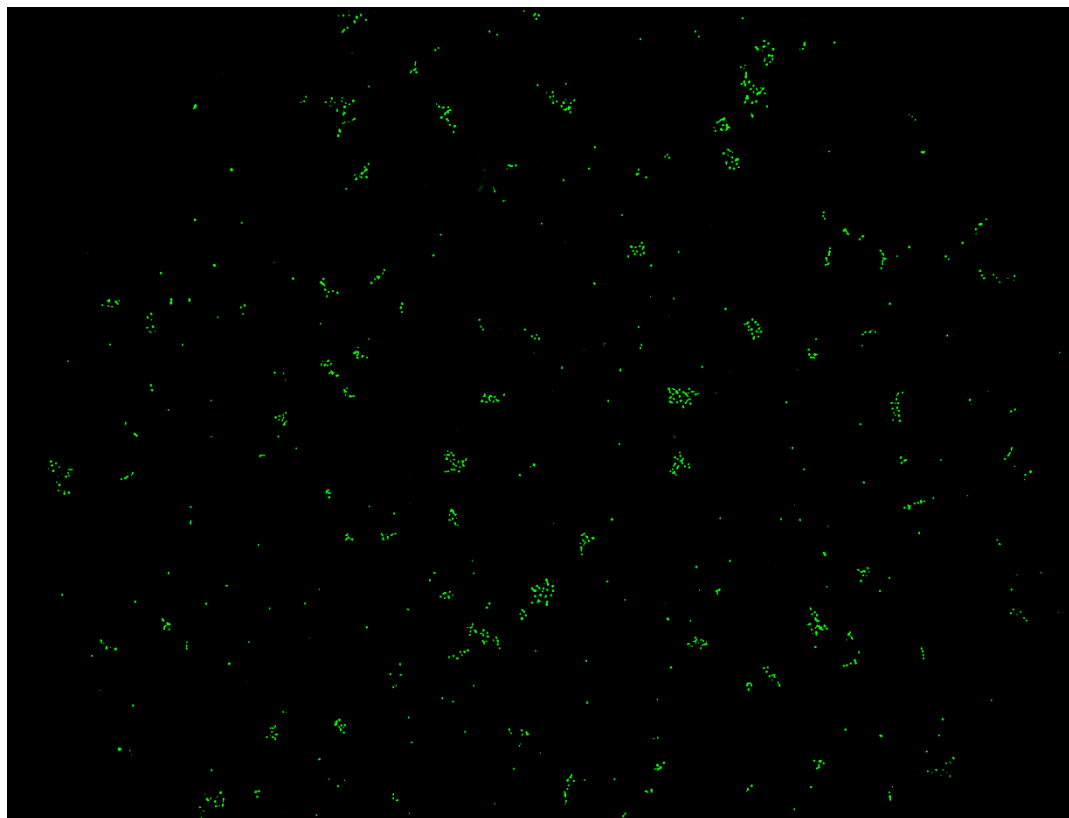
Graf 18: Expresa Bcl-xL po 24 h působení CoCl₂ (500 μ M) a ligandů (10 μ M)

Graf 19 vyjadřuje relativní poměr mezi expresí proteinů Bcl-xL a Bax po 24 h působení CoCl_2 (500 μM) a ligandů (10 μM). Nejnižší poměr byl stanoven u vzorků se samotným CoCl_2 a v kombinacích LPI + CoCl_2 , O-1602 + CoCl_2 , 2-AG + CoCl_2 a 2-AG + CoCl_2 + CID-16020046. Působení ligandů a CoCl_2 trvalo 24 h. Signifikantní změna vůči kontrolnímu vzorku je vyznačena křížkem (Graf 19).

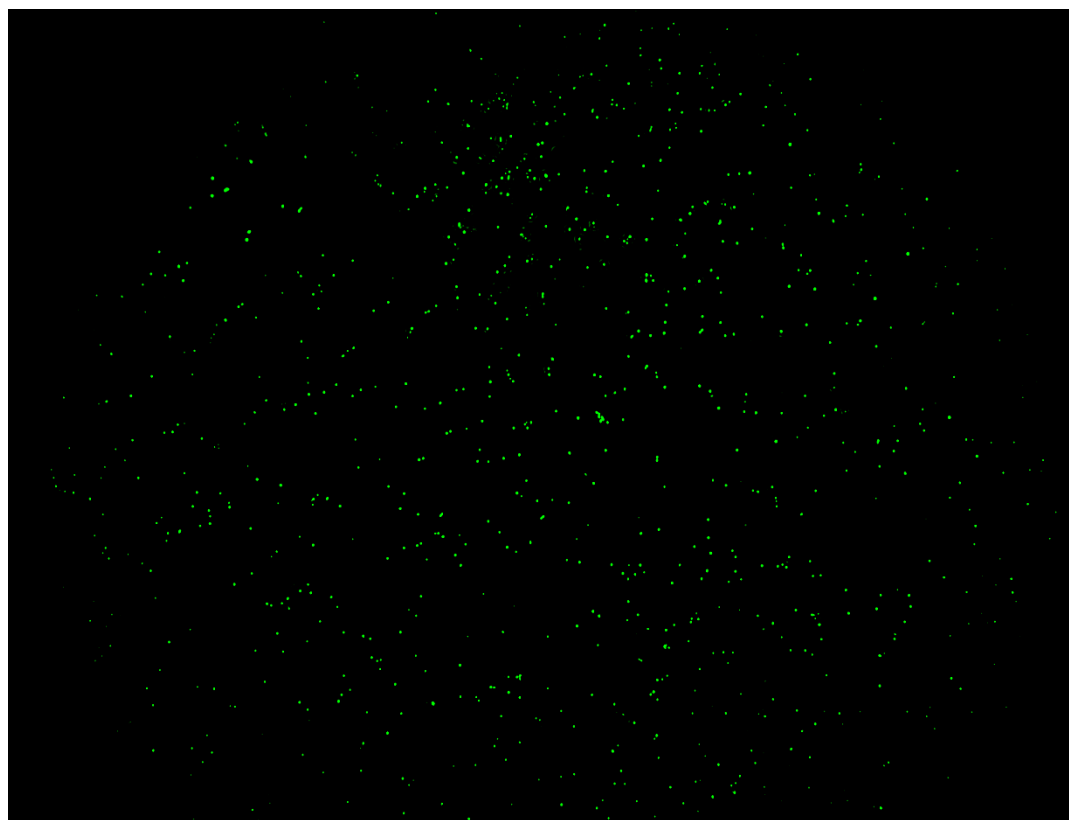


Graf 19: Poměr mezi Bcl-xL a Bax po 24 h působení CoCl_2 (500 μM) a ligandů (10 μM)

Detekce ROS pomocí fluorescenční mikroskopie



Obr. 29: Kontrolní vzorek buněk PC12. Jádra jsou obarvena 20 μM dihydrofluoresceinem 30 minut před pozorováním



Obr. 30: PC12 buňky po 24 h inkubace s 500 μM CoCl₂. Jádra jsou obarvena 20 μM dihydrofluoresceinem 30 minut před pozorováním

Detekce ROS pomocí fluorescenční mikroskopie ukázala, že po 24 h inkubace s 500 μM CoCl_2 nastává disperze buněk a oproti kontrolnímu vzorku nelze pozorovat typické shluky buněk. Intenzita fluorescenčního záření dihydrofluoresceinu nebyla vztažena na intenzitu fluorescenčního záření barvy DAPI. Produkce ROS nebyla kvantifikována a obrázky plní pouze ilustrační funkci (Obr. 30).

Diskuze

Cílem práce bylo objasnit klasifikaci ligandů receptoru GPR55 a zjistit, zda jeho aktivací dochází k cytoprotektivním účinkům v buněčné linii PC12, u které byly hypoxické podmínky simulovány působením CoCl_2 . Kolorimetrickou analýzou bylo změřeno, že po 24 h působení 500 μM CoCl_2 dochází ke zvýšené karboxylaci proteinů. CoCl_2 (500 μM) mimikuje hypoxické podmínky tím, že stabilizuje HIF- α , zvyšuje transkripci některých jako p53, p21 a PCNA a indukuje produkci ROS, které v důsledku poškozují nukleové kyseliny, membránové lipidy a karboxylují proteiny (Guillemin et al., 1997; Chandel et al., 1999; Guillemin et al., 1997). Zvýšená intenzita fluorescence dihydrofluoresceinu v závislosti na aplikaci CoCl_2 nebyla v této diplomové práci kvantifikována. Aplikace CoCl_2 produkci ROS v PC12 buňkách zvyšuje, jak ukázala práce laboratoře Zoua. V závislosti na zvyšující se koncentraci CoCl_2 , docházelo k oxidaci redoxní sondy dihydrodichlorofluoresceinu, jejíž oxidace je způsobena produkcí ROS. Aplikace N-acetyl-cysteinu (10 mM) nebo dithiotreitolu (2mM) signifikantně snižovala produkci ROS při současném působení CoCl_2 . Aplikace aktinomycinu D (0,05 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a cykloheximidu (0,1 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) inhibovala apoptózu, ale nevykazovala žádný efekt na produkci ROS (Zou et al., 2001).

Zvýšená úroveň námi naměřené karboxylace u vzorků s Rimonabantem a CID-16020046 a s 2-AG a CID-16020046 může být způsobena chybou ve změřené koncentraci proteinů, neboť se jedná o vzorky s nejnižší naměřenou koncentrací proteinů, tudíž se při ředění vzorků na stejnou koncentraci proteinů přidával největší objem vzorku v poměru k H_2O . Pokud by ve skutečnosti byla koncentrace vyšší, vysvětlovalo by to zvýšenou absorbanci a tedy vyšší naměřené hodnoty koncentrace karboxylovaných proteinů. Problémem mohla být také různá míra denaturace precipitovaných proteinů. Denaturace proteinů v 6M roztoku guanidinu probíhala ve 37 ° C po dobu 15-45 minut. Nerozpuštěné zbytky byly centrifugovány a do mikrotitrační destičky byl pipetován jen supernatant. Míra denaturace u jednotlivých vzorků tedy ovlivňovala koncentraci proteinů v supernatantu a tudíž i hodnotu absorpance. Kolorimetrickou analýzou peroxidace lipidů se nepodařilo změřit absorbanci u vzorků v kombinacích ligandu s CoCl_2 a CID-16020046, tudíž nebylo zjištěno, zda by kombinace Rimonabantu, CoCl_2 a CID-16020046 a kombinace 2-AG, CoCl_2 a CID-

16020046 způsobovala také peroxidaci lipidů. Cytoprotektivní účinek 2-AG byl popsán u myších makrofágů, kde v závislosti na zvyšující se dávce snižoval expresi TNF- α a snižoval produkci ROS (Gallily et al., 2000), což ukazuje na rozpor s naměřenými výsledky v této diplomové práci, kde naopak aplikace 2-AG karboxylaci proteinů zesiluje. Rozdíl může být dán použitím rozdílných buněčných linií nebo chybným změřením proteinů. Naproti tomu u Rimonabantu byly popsány jeho proapoptotické účinky, kdy u leukemických buněčných linií aplikace Rimonabantu indukovala štěpení kaspáz, depolarizaci mitochondriální membrány a fragmentaci DNA. Produkce ROS nebyla měřena. Je ale možné, že má Rimonabant spolu s CoCl₂ synergický účinek na produkci ROS (Gallotta et al., 2010).

Při studiu signalizace GPR55 jsme se zabývali také detekcí fosforylované formy ERK 1/2 a Akt (PKB) a aktivací GTPázy RhoA. Nepodařilo se prokázat, že při zvyšující se koncentraci ligandu dochází k intenzivnější fosforylaci. Fosforylace probíhala 10 minut při teplotě 37 ° C. LPI byl popsán jako agonista GPR55 receptoru u buněk HEK293 exprimujících tento receptor. LPI v koncentraci 1 μ M rychle navozoval fosforylaci ERK 1/2, přičemž nejvyšší intenzita fosforylace byla detekována po pěti minutách. Po této době intenzita fosforylace slábla. Hodnota EC₅₀ byla změřena jako 200 nM (S. Oka et al., 2007).

Fosforylace ERK 1/2 působením LPI byla popsána i u buněčné linie PC12. Při konstantní koncentraci LPI 20 μ M byla pomocí imunoblotu detekována zvyšující se intenzita fosforylace v rozsahu 0-15 minut. Při konstantní době fosforylace 5 minut byla také detekována zvyšující se intenzita fosforylace, a to v rozsahu 0-30 μ M (Obara et al., 2011). Tyto výsledky se neshodují s výsledky naměřenými v této diplomové práci, kdy byla nejvyšší úroveň fosforylace detekována po 10 minutách v koncentraci LPI 0,1 μ M a zvýšení koncentrace LPI intenzitu fosforylace nezvyšovalo. Rimonabant byl v souvislosti s fosforylací ERK 1/2 popsán jako antagonist GPR55 u buněčné linie HEK293 (Lauckner et al., 2008). Jiná práce dokládá, že triciem značený Rimonabant se vázal na membrány z buněk HEK293 transfekovaných genem pro GPR55 (Ryberg et al., 2007). Naměřené výsledky v této diplomové práci ukazují, že nejvyšší intenzita fosforylace nastává po aplikaci Rimonabantu v koncentraci 0,1 μ M. Syntetický kanabinoid O-1602 byl po vazebných studiích s membránami z buněk HEK293 transfekovaných genem pro GPR55 popsán jako agonista. Fosforylace ERK 1/2 nebyla detekována při koncentraci 10 μ M O-1602 (S. Oka et al., 2009). Výsledky v této diplomové práci ukazují, že aplikace O-1602 intenzitu fosforylace nezvyšuje, ale oproti kontrolnímu vzorku ji snižuje. Vazebnými studii s membránami z buněk HEK293 transfekovaných genem pro GPR55 bylo demonstrováno, že 2-AG má vysokou vazebnou afinitu k GPR55 (Ryberg et al., 2007), ale fosforylace ERK 1/2 nebyla u těchto buněk po aplikaci 2-AG detekována (S. Oka et al., 2007; S. Oka et al., 2009). Inverzní agonista GPR55

CID-16020046 v buňkách HEK293 exprimujících GPR55 receptor inhiboval fosforylaci ERK 1/2 indukovanou působením LPI. 2,5 μM koncentrace LPI navozovala fosforylaci po 25 minutách a aplikace 2,5 μM koncentrace CID-16020046 tuto fosforylaci inhibovala (Kargl et al., 2013). Výsledky naměřené v této diplomové práci ukazují, že koncentrace 100 μM CID-16020046 navozuje fosforylaci ERK 1/2 sama o sobě. O fosforylaci ERK 1/2 působením samotného CID-16020046 není v současné době v literatuře známo. Je možné, že se CID-16020046 ve vysokých koncentracích váže na dosud neidentifikovaný receptor.

Fosforylace proteinkinázy Akt byla po působení LPI popsána v nádorových buněčných liniích OVCAR3, PC-3 a DU-145. Útlum exprese GPR55 receptoru pomocí siRNA fosforylaci Akt významně snižoval. Působení Rimonabantu naopak fosforylaci Akt v těchto buněčných liniích inhibovalo (Pineiro et al., 2011). O vlivu samotných ligandů O-1602 a 2-AG na aktivaci Akt skrze receptor GPR55 není dosud známo. V této diplomové práci se u žádného ligandu nepodařilo prokázat, že by v závislosti na zvyšující se koncentraci docházelo k fosforylaci Akt. Nejvyšší úroveň fosforylace byla u kontrolního vzorku.

Aktivace RhoA byla demonstrována v práci Henstridge u buněčné linie HEK293 stabilně exprimující receptor GPR55. LPI aktivoval skrze receptor GPR55 GTPázu RhoA a tato aktivace byla závislá na $G\alpha_{13}$ podjednotce (Henstridge et al., 2009). Aktivace RhoA po působení LPI byl prokázána i u buněčné linie PC12, ve které bylo demonstrováno stažení neuritů po působení LPI, přičemž signalizace GPR55 byla závislá na aktivaci RhoA (Obara et al., 2011). U Rimonabantu dosud nebyl popsán jeho vliv na aktivaci RhoA skrze GPR55. Ligand O-1602 aktivoval RhoA v buněčné linii HEK293 stabilně exprimující receptor GPR55 a byl identifikován jako potentní agonista GPR55 (Ryberg et al., 2007). 2-AG byl popsán v práci Ryberga jako agonista GPR55, ale aktivace RhoA skrze GPR55 dosud nebyla demonstrována (Ryberg et al., 2007). V této diplomové práci byla pomocí metody imunoblotingu detekována aktivace u všech ligandů kromě 2-AG a CID-16020046. Aplikace 10 μM koncentrace CID-16020046 spolu s 10 μM koncentrací ligandu nesnižovala aktivaci RhoA na úroveň klidového stavu u kontrolního vzorku.

V práci z laboratoře Zoua bylo u buněčné linie PC12 demonstrováno jednak působení CoCl_2 při koncentraci 500 μM po dobu 0-60 h a také působení CoCl_2 po dobu 36 hodin v koncentracích v rozsahu 0-1000 μM . Pomocí imunoblotu byla demonstrována snížená exprese antiapoptotického proteinu Bcl-xL po 48 hodinách působení CoCl_2 v koncentraci 500 μM . Za stejných podmínek nebyla detekována změna v expresi apoptotického proteinu Bax (Zou et al., 2001). V této diplomové práci nebyla změna exprese těchto proteinů po 48 hodinách měřena. Změna exprese byla naopak detekována jen po 24 h působení 500 μM CoCl_2 pouze u proteinu Bax. Snížená exprese Bax po aplikaci CID-16020046 může souviset

se sníženou úrovní fosforylace Akt. V případech kdy, byla aplikována kombinace 10 μ M CID-16020046 a 10 μ M LPI, Rimonabantu nebo O-1602, došlo ke snížení exprese Bax a zároveň byla po 10 minutách kombinace těchto ligandů nejnižší koncentrace fosforylované Akt. Fosforylace Akt navozuje fosforylaci proteinu Bad, který tak nemůže inhibovat protein Bcl-xL. Bcl-xL se tak může vázat na BAX a inhibovat ho, což by mohlo indukovat jeho expresi, aby byla hladina neinhibovaného BAX vyrovnána. Pokud je úroveň fosforylace Akt snížena, je větší množství Bax neinhibovaného, a tudíž buňka nepotřebuje zvyšovat jeho expresi.

Interpretace této práce je poněkud problematická. Inverzní agonista CID-16020046 sice inhibuje efekty způsobené GPR55, už ale nelze vyloučit možnost, že samotný CID-16020046 neovlivňuje jiné receptory. Proto jsou i výsledky v podstatě směsicí efektů zprostředkovaných různými receptory. Problémem také je, že buněčná linie PC12 byla pěstována jako suspenzní, čili při experimentech obsahovala zastoupení apoptotických buněk, které mohly zkreslovat výsledky měření. K lepšímu objasnění funkce GPR55 by mohlo napomoci využití interferující siRNA proti tomuto receptoru. Pokud by byla exprese GPR55 použitím siRNA snížena, byla by úloha jednotlivých ligandů lépe definována.

Závěr

Situace kolem farmakologie GPR55 je stále poměrně záhadná, neboť výsledky různých prací o farmakologii GPR55 jsou často v protikladu. Výsledky této diplomové práce jednoznačně neobjasnily vztah mezi použitými ligandy a receptorem GPR55, ale výsledky imunoblotingu ukázaly sníženou expresi apoptotického proteinu Bax především po aplikaci inverzního agonisty GPR55 CID-16020046, což naznačuje možnou roli v apoptóze. V budoucnu bude potřeba identifikovat a syntetizovat nové vysoce selektivní agonisty a antagonisty GPR55 a pečlivě prostudovat význam koaktivace kanabinoidních receptorů CB₁, CB₂ a GPR55 endokanabinoidy. Jasnější situaci ohledně vztahu mezi endokanabinoidy a GPR55 by přinesly rozsáhlejší studie na různých buněčných kulturách s přirozenou expresí GPR55 a na transfektovaných kulturách s následným využitím siRNA proti mRNA GPR55. Vypnutí genu by pomohlo odhalit roli GPR55 a jeho potenciálních ligandů v buněčné signalizaci. Použití primárních protilátek proti GPR55 spolu s fluorescenčními sekundárními protilátkami by umožnilo pozorovat distribuci receptoru v rámci axonů a těla buněk neuronálních linií po aplikaci NGF nebo jiných ligandů, což by mohlo pomoci objasnit roli GPR55 v neurofyzilogii. Kvantitativní RT-PCR a proteomická analýza by mohla posoudit diferenciální expresi různých genů a proteinů v závislosti na dlouhodobé aplikaci agonistů nebo antagonistů GPR55. Další práce s GPR55^{-/-} myši by mohla objasnit komplexní roli

GPR55 ve fyziologii živočichů a vytvořit tak příležitost pro potenciální terapeutická agens proti nemocem.

Seznam použité literatury

Seznam literatury

- Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., & Nystrom, T. (2003). Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science*, 299(5613), 1751-1753. doi:10.1126/science.1080418
- Baker, D., Pryce, G., Davies, W. L., & Hiley, C. R. (2006). In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(1), 1-4. doi:10.1016/j.tips.2005.11.003
- Barrie, A. P., Clohessy, A. M., Buensuceso, C. S., Rogers, M. V., & Allen, J. M. (1997). Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide stimulates extracellular signal-regulated kinase 1 or 2 (ERK1/2) activity in a Ras-independent, mitogen-activated protein Kinase/ERK kinase 1 or 2-dependent manner in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(32), 19666-19671.
- Brady, H. J., Gil-Gomez, G., Kirberg, J., & Berns, A. J. (1996). Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *EMBO Journal*, 15(24), 6991-7001.
- Brigelius- Flohé, R., & Flohé, L. (2003). Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation? *BioFactors*, 17(1- 4), 93-102.
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(6), 749-762. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, 326 (Pt 1), 1-16.
- Cory, S., Strasser, A., Jacks, T., Corcoran, L. M., Metz, T., Harris, A. W., & Adams, J. M. (1994). Enhanced cell survival and tumorigenesis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 59, 365-375.
- Cosgrove, J. P., Church, D. F., & Pryor, W. A. (1987). The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 22(5), 299-304.
- D'Arcangelo, G., & Halegoua, S. (1993). A branched signaling pathway for nerve growth factor is revealed by Src-, Ras-, and Raf-mediated gene inductions. *Molecular and Cellular Biology*, 13(6), 3146-3155.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2006). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(2), 389-406. doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x
- Diaz-Arteaga, A., Vazquez, M. J., Vazquez-Martinez, R., Pulido, M. R., Suarez, J., Velasquez, D. A., . . . Nogueiras, R. (2012). The atypical cannabinoid O-1602 stimulates food intake and adiposity in rats. *Diabetes Obesity & Metabolism*, 14(3), 234-243. doi:10.1111/j.1463-1326.2011.01515.x
- Finucane, D. M., Bossy-Wetzel, E., Waterhouse, N. J., Cotter, T. G., & Green, D. R. (1999). Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *Journal of Biological Chemistry*, 274(4), 2225-2233.
- Fowler, C. J., Holt, S., Nilsson, O., Jonsson, K. O., Tiger, G., & Jacobsson, S. O. P. (2005). The endocannabinoid signaling system: Pharmacological and therapeutic aspects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(2), 248-262. doi:10.1016/j.pbb.2005.01.023

- Gallily, R., Breuer, A., & Mechoulam, R. (2000). 2-Arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid, inhibits tumor necrosis factor- α production in murine macrophages, and in mice. *European Journal of Pharmacology*, 406(1), R5-7.
- Gallotta, D., Nigro, P., Cotugno, R., Gazerro, P., Bifulco, M., & Belisario, M. A. (2010). Rimonabant-induced apoptosis in leukemia cell lines: activation of caspase-dependent and-independent pathways. *Biochemical Pharmacology*, 80(3), 370-380.
- Green, D. R., & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381), 1309-1312. doi:10.1126/science.281.5381.1309
- Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), 2424-2428.
- Grune, T., Jung, T., Merker, K., & Davies, K. J. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(12), 2519-2530. doi:10.1016/j.biocel.2004.04.020
- Guillemin, K., & Krasnow, M. A. (1997). The hypoxic response: Huffing and HIFing. *Cell*, 89(1), 9-12. doi:10.1016/s0092-8674(00)80176-2
- Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., & Kano, M. (2007). Ca²⁺-assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 360-365. doi:10.1016/j.conb.2007.03.012
- Henstridge, C. M., Balenga, N. A., Ford, L. A., Ross, R. A., Waldhoer, M., & Irving, A. J. (2009). The GPR55 ligand L- α -lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB Journal*, 23(1), 183-193. doi:10.1096/fj.08-108670
- Chandel, N. S., & Schumacker, P. T. (1999). Cells depleted of mitochondrial DNA (rho(0)) yield insight into physiological mechanisms. *FEBS Letters*, 454(3), 173-176. doi:10.1016/s0014-5793(99)00783-8
- Ishiguro, H., Onaivi, E. S., Horiuchi, Y., Imai, K., Komaki, G., Ishikawa, T., . . . Arinami, T. (2011). Functional Polymorphism in the GPR55 Gene is Associated With Anorexia Nervosa. *Synapse*, 65(2), 103-108. doi:10.1002/syn.20821
- Iwai, K., Drake, S. K., Wehr, N. B., Weissman, A. M., LaVaute, T., Minato, N., . . . Rouault, T. A. (1998). Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 4924-4928.
- Jana, C. K., Das, N., & Sohal, R. S. (2002). Specificity of age-related carbonylation of plasma proteins in the mouse and rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2), 433-439. doi:10.1006/abbi.2001.2690
- Johns, D. G., Behm, D. J., Walker, D. J., Ao, Z., Shapland, E. M., Daniels, D. A., . . . Douglas, S. A. (2007). The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *British Journal of Pharmacology*, 152(5), 825-831. doi:10.1038/sj.bjp.0707419
- Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., & Reed, J. C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 4997-5002.
- Kargl, J., Brown, A. J., Andersen, L., Dorn, G., Schicho, R., Waldhoer, M., & Heinemann, A. (2013). A selective antagonist reveals a potential role of G protein-coupled receptor 55 in platelet and endothelial cell function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 346(1), 54-66. doi:10.1124/jpet.113.204180

- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis - Basic biological phenomenon with wide-rangin implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-&. doi:10.1038/bjc.1972.33
- Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Medicine*, 3(6), 614-620.
- Lauckner, J. E., Jensen, J. B., Chen, H. Y., Lu, H. C., Hille, B., & Mackie, K. (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2699-2704. doi:10.1073/pnas.0711278105
- Liu, B., Song, S., Jones, P. M., & Persaud, S. J. (2015). GPR55: from orphan to metabolic regulator? *Pharmacology & Therapeutics*, 145, 35-42. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.06.007
- Martin-Gallan, P., Carrascosa, A., Gussinye, M., & Dominguez, C. (2003). Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(12), 1563-1574.
- Martinou, J. C., & Youle, R. J. (2011). Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. *Developmental Cell*, 21(1), 92-101. doi:10.1016/j.devcel.2011.06.017
- Monet, M., Gkika, D., Lehen'kyi, V. y., Pourtier, A., Abeele, F. V., Bidaux, G., . . . Prevarsakaya, N. (2009). Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1793(3), 528-539. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.01.003
- Moreno-Navarrete, J. M., Catalan, V., Whyte, L., Diaz-Arteaga, A., Vazquez-Martinez, R., Rotellar, F., . . . Nogueiras, R. (2012). The L-alpha-lysophosphatidylinositol/GPR55 system and its potential role in human obesity. *Diabetes*, 61(2), 281-291. doi:10.2337/db11-0649
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417, 1-13. doi:10.1042/bj20081386
- Niki, E., & Noguchi, N. (2004). Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Accounts of Chemical Research*, 37(1), 45-51. doi:10.1021/ar030069m
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., & Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 668-676. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.072
- Obara, Y., Ueno, S., Yanagihata, Y., & Nakahata, N. (2011). Lysophosphatidylinositol causes neurite retraction via GPR55, G13 and RhoA in PC12 cells. *PloS One*, 6(8), e24284. doi:10.1371/journal.pone.0024284
- Oka, S., Kimura, S., Toshida, T., Ota, R., Yamashita, A., & Sugiura, T. (2010). Lysophosphatidylinositol induces rapid phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and activating transcription factor 2 in HEK293 cells expressing GPR55 and IM-9 lymphoblastoid cells. *Journal of Biochemistry*, 147(5), 671-678. doi:10.1093/jb/mvp208
- Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S., & Sugiura, T. (2007). Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(4), 928-934. doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.078
- Oka, S., Toshida, T., Maruyama, K., Nakajima, K., Yamashita, A., & Sugiura, T. (2009). 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *Journal of Biochemistry*, 145(1), 13-20. doi:10.1093/jb/mvn136
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74(4), 609-619.

- Pineiro, R., Maffucci, T., & Falasca, M. (2011). The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene*, 30(2), 142-152. doi:10.1038/onc.2010.417
- Rao, L., Perez, D., & White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 135(6 Pt 1), 1441-1455.
- Requena, J. R., Chao, C. C., Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (2001). Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1), 69-74. doi:10.1073/pnas.011526698
- Romero-Zerbo, S. Y., Rafacho, A., Diaz-Arteaga, A., Suarez, J., Quesada, I., Imbernon, M., . . . Bermudez-Silva, F. J. (2011). A role for the putative cannabinoid receptor GPR55 in the islets of Langerhans. *Journal of Endocrinology*, 211(2), 177-185. doi:10.1530/JOE-11-0166
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), 356-363. doi:10.1038/nature08144
- Ross, G. R., Lichtman, A., Dewey, W. L., & Akbarali, H. I. (2012). Evidence for the putative cannabinoid receptor (GPR55)-mediated inhibitory effects on intestinal contractility in mice. *Pharmacology*, 90(1-2), 55-65. doi:10.1159/000339076
- Ross, R. A. (2009). The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(3), 156-163. doi:10.1016/j.tips.2008.12.004
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J., . . . Greasley, P. J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*, 152(7), 1092-1101. doi:10.1038/sj.bjp.0707460
- Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D. K., Lynch, K. R., Cheng, R., Heng, H. H., . . . O'Dowd, B. F. (1999). Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Research: Molecular Brain Research*, 64(2), 193-198.
- Starkov, A. A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B. J., Browne, S. E., Patel, M. S., & Beal, M. F. (2004). Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *Journal of Neuroscience*, 24(36), 7779-7788. doi:10.1523/JNEUROSCI.1899-04.2004
- Thompson, C. B. (1995). APOPTOSIS IN THE PATHOGENESIS AND TREATMENT OF DISEASE. *Science*, 267(5203), 1456-1462. doi:10.1126/science.7878464
- Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., . . . Nicholson, D. W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(29), 17907-17911.
- Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, 75(2), 229-240.
- Venkatakrishnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., & Babu, M. M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 494(7436), 185-194. doi:10.1038/nature11896
- Waldeck-Weiermair, M., Zoratti, C., Osibow, K., Balenga, N., Goessnitzer, E., Waldhoer, M., . . . Graier, W. F. (2008). Integrin clustering enables anandamide-induced Ca²⁺ signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 10), 1704-1717. doi:10.1242/jcs.020958
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284(5756), 555-556.
- Xiao, R. P., Cheng, H., Zhou, Y. Y., Kuschel, M., & Lakatta, E. G. (1999). Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. *Circulation Research*, 85(11), 1092-1100.

- Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., & Millhorn, D. E. (2003). Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α . *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15911-15916.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., & Korsmeyer, S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, 87(4), 619-628.
- Zou, W., Yan, M., Xu, W., Huo, H., Sun, L., Zheng, Z., & Liu, X. (2001). Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation. *Journal of Neuroscience Research*, 64(6), 646-653.